



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad De Ciencias Veterinarias

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Efecto de la administración de un anestésico local para la prevención y/o recuperación temprana de la lesión neuronal inducida por una neurotoxina.

Farm. SISTI, María Susana

DIRECTORES

Prof. Dr. PORTIANSKY, Enrique Leo

Dr. NISHIDA, Fabián

Realizado en el Laboratorio de Análisis de imágenes, Cátedra de Patología
General Veterinaria. FCV. UNLP.

Miembros del jurado:

Prof. Dra. LANDONI, María Fabiana

Dr. MOREL, Gustavo Ramón

Prof. Dr. VERDES, José Manuel

2018

A Catalina y Mateo

“No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo. ...
...Porque no estás solo, porque yo te quiero”

Mario Benedetti.
(fragmento del poema No te rindas)

Quiero agradecer,

todos los momentos vividos durante el desarrollo de este trabajo de tesis; los alegres y felices, pero también los de frustración y enojo; porque todos me han ayudado a crecer.

A todas aquellas personas que de diversas maneras han formado parte de mi vida y compartido el camino que me trajo hoy hasta aquí. En especial:

A la **Dra. Romina Araya**, gran amiga que me ha regalado la vida. Nada de esto hubiese sido posible sin ella, nuestra amistad es un tesoro para mí.

Al **Dr. Enrique Portiansky**, por animarse a darme esta oportunidad, por acompañarme a lo largo de este proceso, por su puerta siempre abierta, sus consejos y su generosidad.

Al **Dr. Fabián Nishida (Faby)**; por su excelencia, grandeza, humildad, generosidad y paciencia. Por su incansable vocación docente, su amabilidad, empatía y simpatía. Por todos los momentos compartidos, por las risas de todos los días, y por todos los días compartidos, por ayudarme a superarme, por ser una gran persona, y por honrarme con su amistad.

A la **Dra. Carolina Zanuzzi**, excelente profesional y aún mejor persona. Por su compañía, predisposición para ayudar y enseñar, por compartir conmigo su sabiduría y su amistad. Por el camino matutino compartido entre charlas, por esperarme estoicamente esos minutos de más, por los almuerzos entre risas y por las risas de todos los días.

A **Héctor Enrique**, por su gran espíritu, predisposición, colaboración y en especial por la dedicación y respeto puesto en el cuidado de los animales de experimentación. Por todos los momentos compartidos, por esos pequeños gestos y detalles diarios que nos facilitan la vida. Por los matecitos de todas las mañanas y por abrirnos la puerta todos los días con una sonrisa.

Al **Dr. Eduardo Gimeno**, por los momentos compartidos, por su calidez, por su humildad, por su generosidad y por sacarnos siempre una sonrisa con sus chistes.

Al equipo docente de la **Cátedra de Patología General Veterinaria**: la **Dra. Patricia Fernández**, el **Dr. Claudio Barbeito**, las Med. Vet. **Andrea Pachamé**, **Andrea Santelices**, **Carolina Wright**, **Jesica Grandinetti**, **Fabiana Paulovich**, **Lorena Migliorisi**, **Silvana Scenna**, **Jesica Granero**; al Med Vet. **Juan Falcón** y a la casi Med. Vet. **Agustina Camiña**; por permitirme formar parte de este hermoso grupo y aprender de todos Uds. Quiero

agradecerles particularmente, que aun siendo una “forastera” me hayan abierto las puertas de su lugar, de su espacio, y me hicieran sentir bienvenida desde el primer día. Gracias por las largas jornadas de los miércoles y por tantos mates compartidos.

A **Guadalupe Guidi**, por la asistencia brindada en el laboratorio, a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A la **Facultad de Ciencias Veterinarias** que prestó el lugar para que la realización de este trabajo fuese posible.

A la **Universidad Nacional de La Plata**, por brindarme educación superior gratuita y de excelente calidad.

A la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica** y al **CONICET**, entidades que otorgaron las becas que posibilitaron la realización de este trabajo.

A **mamá**, por amarme, educarme, por apoyarme, aunque no me entienda y por ser incondicional...por ser MI mamá.

A **papá**, por estar, por entenderme y acompañarme, aunque no siempre estemos de acuerdo. Por enseñarme, educarme y guiarme con su ejemplo...por ser MI papá.

A **Cristina**, por tener fe en mí.

A **Catalina** y **Mateo**, mis sobrinos adorados, por hacerme tan feliz.

A **Ale**, **Gaby**, **Nancy**, **Javier** y **Rosa María**, que siempre han apoyado y alentado mis locuras, porque eso es lo que hacen los amigos.

A mi querido **Coro Juglar**, ese hermoso espacio donde somos artistas por un rato, y hacemos amigos para toda la vida. Por todas las vivencias compartidas a través de la música, que alimenta el alma.

A **Jesi**, **Agus**, **Martina**, **Faby**, **Juan** y **Diego**, por las salidas y las charlas compartidas.

A **Agustina Camiña** y **Martina von Wernich**, por animarse a hacer su primera experiencia en investigación dentro de nuestro grupo, y ofrecerme la oportunidad de aportarles algo desde mi humilde experiencia.

Y para todos aquellos que por una mala jugada del olvido no he mencionado, vaya mi más sincera gratitud.

TRABAJOS PUBLICADOS CON ASPECTOS PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

Publicaciones en revistas nacionales/internacionales

Sisti MS; Nishida F; Zanuzzi CN; Portiansky EL. 2018. Uso de la técnica CLARITY para la identificación de marcadores fluorescentes en cortes gruesos de la médula espinal. *Analecta Veterinaria* 38(1): 16-22.
doi.org/10.24215/15142590e021.

Sisti MS, Zanuzzi CN, Nishida F, Cantet RJC, Portiansky EL. 2018. Effects of an intraparenchymal injection of lidocaine in the rat cervical spinal cord. *Neurochemical Research*.
doi: 10.1007/s11064-018-2628-2.

Publicaciones en actas de congresos

Sisti, MS; Nishida, F; Zanuzzi, CN; Barbeito, CG; Portiansky, EL. 2014. Análisis morfométrico de los segmentos cervicales de la médula espinal de ratas inoculadas con ácido kaínico. XVI Congreso y 13° Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. La Plata, Argentina.

Sisti, MS; Nishida, F; Zanuzzi, CN; Portiansky, EL. 2015. Implementación de la técnica modificada de C.L.A.R.I.T.Y para la identificación inmunofluorescente de componentes de la médula espinal de rata. XVII Congreso y 14° Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata.

Sisti MS, Nishida F, Zanuzzi CN, Portiansky EL. 2016. Neuroprotective effects of lidocaine in a rat spinal cord neurodegenerative model induced by Kainic acid. 2nd Federation of Neuroscience Societies in Latin American, Caribbean and Iberian Peninsula (FALAN) Congress, 17 a 20 de octubre de 2016. Buenos Aires, Argentina. S3P710.

Sisti MS, Nishida F, Zanuzzi CN, Camiña AE, von Wernich M, Portiansky EL. 2017. Lidocaine does not modify GFAP and NF expression in an excitotoxic spinal cord injury model. XXX II Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 25 al 27 de septiembre de 2017. P.40.

Tabla de contenidos

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	7
<i>1.1.1 Desarrollo y formación</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2 Células del sistema nervioso</i>	<i>12</i>
1.1.2.1 Neuronas	13
1.1.2.2 Astrocitos.....	16
1.1.2.3 Oligodendrocitos.....	18
1.1.2.4 Microglía	18
1.1.2.5 Células endoteliales	19
<i>1.1.3 Médula espinal</i>	<i>19</i>
1.1.3.1 Citoarquitectura de la médula espinal	26
1.1.3.2 Centros neurales responsables del movimiento.....	31
1.1.3.3 Tractos de la médula espinal	33
<i>1.1.4 Meninges y sistema ventricular</i>	<i>54</i>
1.2 LESIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	57
<i>1.2.1 Respuesta de las neuronas a la lesión.....</i>	<i>57</i>
<i>1.2.2 Reacciones de las células de la glía a la lesión.....</i>	<i>61</i>
1.2.2.1 Astrocitos.....	61
1.2.2.2 Oligodendrocitos	61
1.2.2.3 Microglía	62
<i>1.2.3 Principales causas de lesiones del SNC.....</i>	<i>62</i>
1.2.3.1 Edema cerebral, hidrocefalia; presión intracraneal elevada y hernia...	62
1.2.3.2 Malformaciones y trastornos del desarrollo.....	63
1.2.3.3 Traumas	63
1.2.3.4 Injurias traumáticas vasculares	64
1.2.3.5 Enfermedades cardiovasculares	64
1.2.3.6 Infecciones	64
1.2.3.7 Enfermedades por priones.....	65
1.2.3.8 Enfermedades metabólicas genéticas	65
1.2.3.9 Enfermedades metabólicas tóxicas y adquiridas	66
1.2.3.10 Tumores.....	66
1.2.3.11 Enfermedades desmielinizantes.....	67
1.2.3.12 Enfermedades neurodegenerativas	67
1.3 EXCITOTOXICIDAD	76
<i>1.3.1 Ácido kaínico</i>	<i>81</i>

1.4	EXCITOTOXICIDAD E INJURIA DE LA MÉDULA ESPINAL.....	82
1.4.1	<i>Modelos de injuria de la médula espinal en animales de laboratorio</i>	<i>84</i>
1.4.1.1	Transección	84
1.4.1.2	Contusión	85
1.4.1.3	Compresión	85
1.4.1.4	Injuria de la médula espinal mediada por agentes químicos.....	86
1.5	ANESTÉSICOS LOCALES.....	88
1.5.1.	<i>Canal de sodio regulado por voltaje.....</i>	<i>93</i>
1.5.2	<i>Usos farmacológicos de los AL</i>	<i>95</i>
1.5.2.1	Efectos en el sistema cardiovascular	95
1.5.2.2	Efectos en el SNC	96
1.5.2.3	Efectos en el músculo liso	96
1.5.3	<i>Lidocaína.....</i>	<i>97</i>
1.5.3.1	Lidocaína como antiepiléptico	97
1.5.3.2	Tratamiento del dolor	98
1.5.3.3	Signos neurológicos transitorios.....	99
1.5.3.4	Efectos sobre la curación de heridas	101
1.5.3.5	Efectos sobre la proliferación y supervivencia de diferentes poblaciones celulares.....	101
1.5.3.6	Efectos antiinflamatorios.....	103
1.5.3.7	Efectos neuroprotectores	104
1.6	HIPÓTESIS.....	107
1.7	OBJETIVOS	108
1.7.1	<i>OBJETIVO GENERAL</i>	<i>108</i>
1.7.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	<i>108</i>
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	109
2.1	ANIMALES	109
2.2	SOLUCIONES UTILIZADAS.....	110
2.3	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESQUEMA DE INOCULACIÓN DE LOS ANIMALES.....	111
2.4	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)	115
2.5	INYECCIÓN INTRAPARENQUIMATOSA EN EL SEGMENTO CERVICAL C5	119
2.6	INYECCIÓN EN CISTERNA MAGNA	122
2.7	EVALUACIÓN CLÍNICA.....	124
2.7.1.	<i>Evaluación del peso</i>	<i>124</i>
2.8	PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO.....	124
2.8.1	<i>Prueba sensitiva</i>	<i>125</i>
2.8.1.1	Sensibilidad al calor	125
2.8.2	<i>Pruebas motoras</i>	<i>126</i>
2.8.2.1	Prueba de suspensión en el aire.....	126
2.8.2.2	Desplazamiento en escalera horizontal.....	127
2.9	EUTANASIA DE LOS ANIMALES Y EXTRACCIÓN DE LOS ÓRGANOS DE INTERÉS	129

2.10 SECCIONAMIENTO DE LA MÉDULA ESPINAL	131
2.11 HISTOQUÍMICA	132
2.12 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	133
2.13 TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF)	135
2.14 FLUORO-JADE B	137
2.15 TÉCNICA DE CLARITY	137
2.15.1 IF en muestras tratadas con CLARITY	142
2.16 ANÁLISIS DE IMÁGENES	144
2.16.1 Captura de imágenes	144
2.16.2 Análisis morfométrico	145
2.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	147
3. RESULTADOS	150
3.1. ETAPA 1. INYECCIÓN INTRAPARENQUIMATOSA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LIDOCAÍNA	150
3.1.1. Evaluación clínica. Estado general y comportamiento motriz	150
3.1.2. Evaluación del peso	150
3.1.3. Pruebas de comportamiento	151
3.1.3.1. Sensibilidad al calor	151
3.1.3.2. Suspensión en el aire	152
3.1.3.3. Desplazamiento en escalera horizontal	153
3.1.2. Histoquímica	157
3.1.2.1. Identificación de mielina mediante Luxol Fast Blue	159
3.1.3. Inmunohistoquímica	159
3.1.3.1. Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN	159
3.1.3.2. Identificación y determinación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP	160
3.1.3.3. Identificación y determinación de neurofilamentos mediante el anticuerpo anti-NF	162
3.1.4. Inmunofluorescencia	164
3.1.4.1. GFAP+PCNA	164
3.1.4.2. Fluoro-Jade B	165
3.1.5. Análisis Morfométrico	167
3.1.5.1. Región ventral	170
3.1.5.2. Regiones dorsal y central	176
3.1.6 DISCUSIÓN	178
3.2. ETAPA 2: INYECCIÓN INTRAPARENQUIMATOSA SIMULTANEA DE LA CONCENTRACIÓN SELECCIONADA DE LIDOCAÍNA Y KA	188
3.2.1. Ausencia de interacción química entre el KA y la lidocaína .	188
3.2.2. Inyección simultánea de lidocaína 0,5% y KA 1 mM	192
3.2.2.1. Estado general y comportamiento motriz	192
3.2.2.2. Evaluación del peso	193
3.2.2.3. Pruebas comportamentales	194
3.2.2.4. Histoquímica	199
3.2.2.5. Inmunohistoquímica	201
3.2.2.6. Inmunofluorescencia	204

3.2.2.7. Análisis Morfométrico	208
3.2.3. <i>Inyección simultánea de lidocaína 1 % + KA 1 mM</i>	217
3.3. ETAPA 3: TRATAMIENTO DE LA LESIÓN INDUCIDA POR KA MEDIANTE UNA INYECCIÓN DE LIDOCAÍNA 0,5 %	218
3.3.1. <i>Estado general y comportamiento motriz</i>	218
3.3.2. <i>Evaluación del peso</i>	218
3.3.3. <i>Pruebas funcionales</i>	219
3.3.3.1. Sensibilidad al calor	219
3.3.3.2. Suspensión en el aire	220
3.3.3.3. Desplazamiento en escalera horizontal	220
3.3.4. <i>Histoquímica</i>	224
3.3.4.1. Identificación de mielina	224
3.3.5. <i>Inmunohistoquímica</i>	225
3.3.5.1. Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN	225
3.3.5.2. Identificación y determinación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP	226
3.3.5.3. Identificación y determinación de neurofilamentos mediante el anticuerpo anti-NF	227
3.3.6. <i>Análisis morfométrico</i>	228
3.3.6.1. Región ventral	230
3.3.6.2. Regiones dorsal y central	234
3.3.7 <i>DISCUSIÓN</i>	235
4. CONCLUSIONES	245
5. BIBLIOGRAFÍA	246
ANEXO 1	268
A1.1 PRUEBAS COMPORTAMENTALES	268
A1.1.1 <i>Prueba de sensibilidad al calor</i>	268
A1.1.2 <i>Prueba de suspensión en el aire</i>	268
A1.1.3 <i>Desplazamiento en escalera horizontal</i>	269
A1.2 AUSENCIA DE INTERACCIÓN QUÍMICA ENTRE EL KA Y LA LIDOCAÍNA	270
A1.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	271
A1.3.1 <i>Etapa 1</i>	271
A1.3.1.1 Región dorsal	271
A1.3.1.2 Región media	276
A1.3.2 <i>Etapa 2</i>	280
A1.3.2.1 Región dorsal	280
A1.3.2.2 Región media	284
A1.3.3 <i>Etapa 2</i>	288
A1.3.3.1 Región dorsal	288
A1.3.3.2 Región media	291
A1.4. RECuento NEURONAL	295

TRABAJOS PUBLICADOS CON ASPECTOS PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

Publicaciones en revistas nacionales/internacionales

Sisti MS; Nishida F; Zanuzzi CN; Portiansky EL. 2018. Uso de la técnica CLARITY para la identificación de marcadores fluorescentes en cortes gruesos de la médula espinal. *Analecta Veterinaria* 38(1): 16-22.
doi.org/10.24215/15142590e021.

Sisti MS, Zanuzzi CN, Nishida F, Cantet RJC, Portiansky EL. 2018. Effects of an intraparenchymal injection of lidocaine in the rat cervical spinal cord. *Neurochemical Research*.
doi: 10.1007/s11064-018-2628-2.

Publicaciones en actas de congresos

Sisti, MS; Nishida, F; Zanuzzi, CN; Barbeito, CG; Portiansky, EL. 2014. Análisis morfométrico de los segmentos cervicales de la médula espinal de ratas inoculadas con ácido kaínico. XVI Congreso y 13° Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. La Plata, Argentina.

Sisti, MS; Nishida, F; Zanuzzi, CN; Portiansky, EL. 2015. Implementación de la técnica modificada de C.L.A.R.I.T.Y para la identificación inmunofluorescente de componentes de la médula espinal de rata. XVII Congreso y 14° Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata.

Sisti MS, Nishida F, Zanuzzi CN, Portiansky EL. 2016. Neuroprotective effects of lidocaine in a rat spinal cord neurodegenerative model induced by Kainic acid. 2nd Federation of Neuroscience Societies in Latin American, Caribbean and Iberian Peninsula (FALAN) Congress, 17 a 20 de octubre de 2016. Buenos Aires, Argentina. S3P710.

Sisti MS, Nishida F, Zanuzzi CN, Camiña AE, von Wernich M, Portiansky EL. 2017. Lidocaine does not modify GFAP and NF expression in an excitotoxic spinal cord injury model. XXX II Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 25 al 27 de septiembre de 2017. P.40.

ABREVIATURAS

AL: anestésico local

BSA: albúmina sérica bovina

CLARITY: Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/*In situ* hybridization-compatible Tissue hydrogel

DAB: 3',3'diaminobencidina

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

IF: Inmunofluorescencia

IHQ: Inmunohistoquímica

KA: ácido kaínico; (ácido (2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil)-acético monohidrato)

KA1L05: 1 mM KA - 0,5 % lidocaína

KA1L1: 1 mM KA - 1 % lidocaína

KA1L2: 1 mM KA - 2% lidocaína

L05: 0,5 % lidocaína

L1: 1 % lidocaína

L2: 2 % lidocaína

LCR: líquido cefalorraquídeo

NeuN: Proteína nuclear específica de neuronas

NF: neurofilamento

PBS: tampón fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PFA: paraformaldehído

SCI: injuria de la médula espinal, del inglés *spinal cord injury*

VIM: vimentina

RESUMEN

Efecto de la administración de un anestésico local para la prevención y/o recuperación temprana de la lesión neuronal inducida por una neurotoxina

La lidocaína puede ejercer efectos neuroprotectores sobre el sistema nervioso cuando se la administra por diferentes vías. Sin embargo, muy poco se sabe acerca de sus efectos luego de la administración intraparenquimatosa en la médula espinal. La excitotoxicidad es un proceso considerado fundamental para la progresión de las lesiones después de una injuria de la médula espinal. El ácido kaínico, es un reconocido agente excitotóxico que emula la liberación patológica de glutamato. Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron determinar tanto si la inyección intraparenquimatosa de diferentes concentraciones de lidocaína en la médula espinal de rata ocasiona alteraciones tisulares y/o funcionales, como también, si la lidocaína ejerce efectos protectores/preventivos contra la excitotoxicidad desencadenada por el ácido kaínico. Para determinarlo, se utilizó un modelo experimental de rata, previamente validado. En una primera etapa, se inyectaron diferentes concentraciones de lidocaína, por vía intraparenquimatosa, en la médula espinal. Una vez determinada una concentración que no produjo alteraciones histológicas ni funcionales, se procedió a la segunda etapa, donde la inyección de lidocaína a la concentración establecida se llevó a cabo tanto en forma simultánea como posterior (por vía intraparenquimatosa e intra-Cisterna Magna, respectivamente) a la inyección del ácido kaínico. Se evaluaron las funciones motoras y sensitivas de los animales en diferentes días establecidos durante el experimento, y luego de la eutanasia, se evaluaron las alteraciones histológicas del segmento C5 mediante histoquímica, inmunohistoquímica e

inmunofluorescencia. La menor concentración de lidocaína inyectada (0,5 %) no produjo daño aparente sobre la médula espinal. Más aun, al ser inyectada simultáneamente con el ácido kaínico redujo significativamente todas las lesiones ocasionadas por dicho agente excitotóxico. Por lo tanto, la lidocaína podría considerarse como un fármaco neuroprotector en modelos en los que la excitotoxicidad es el principal mecanismo de lesión.

Palabras clave: lidocaína- ácido kaínico- excitotoxicidad- neuroprotección- médula espinal.

SUMMARY

Effect of the administration of a local anesthetic for the prevention and/or early recovery of neuronal injury induced by a neurotoxin

Lidocaine can exert neuroprotective effects on the nervous system when it is administered by different routes. However, little is known about its effects after intraparenchymal administration into the spinal cord. Excitotoxicity is a high relevant process for the progression of the lesions after a spinal cord injury. Kainic acid is a recognized excitotoxic agent that emulates the pathological release of glutamate. The main goals of this thesis were to determine whether the intraparenchymal injection of different concentrations of lidocaine in the rat spinal cord causes tissue and/or functional alterations, as well as whether lidocaine exert protective/preventive effects against the excitotoxicity induced by the kainic acid. To achieve these goals, a previously validated experimental excitotoxic rat model was used. In the first stage of the experiments different concentrations of lidocaine were intraparenchymally injected into the spinal cord. The second stage began once a concentration not producing histological or functional alterations was determined. There, lidocaine (at the established concentration) was either simultaneously or previously injected with kainic acid, by intraparenchymal or intracisternal routs, respectively. Rats motor and sensory performances were registered on different preestablished days during the experiment. After euthanasia, the histological alterations of the C5 segment were evaluated by histochemistry, immunohistochemistry and immunofluorescence. The lowest concentration of lidocaine (0.5%) injected did not cause any apparent damage to the spinal cord. Moreover, when it was simultaneously injected with kainic acid it significantly reduced the injuries

caused by the excitotoxic agent. Therefore, lidocaine could be considered as a neuroprotective drug in models in which excitotoxicity is the main mechanism of injury.

Keywords: lidocaine- kainic acid- excitotoxicity- neuroprotection-spinal cord.

Introducción

"No vayas a creer lo que te cuentan del mundo
(ni siquiera esto que te estoy contando), ya te
dije que el mundo es incontable".

Mario Benedetti.
Escritor y poeta uruguayo

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) puede sufrir agresiones de índole muy diversa, y cada tipo de daño induce respuestas específicas por parte de este. Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por la pérdida progresiva e irreversible de neuronas de regiones específicas del sistema nervioso. En conjunto, estos trastornos son relativamente frecuentes y constituyen problemas de tipo médico y social de relevancia, tanto en el ámbito de la medicina humana como veterinaria. En la actualidad, el tratamiento de estos padecimientos se halla limitado a terapéuticas sintomáticas que no alteran la evolución de la enfermedad subyacente, de modo que el hallazgo o la creación de nuevas estrategias terapéuticas resulta de particular interés. La característica más sobresaliente de este grupo de trastornos es la especificidad que muestran los diferentes procesos patológicos por tipos particulares de neuronas. Esas particularidades han conducido a considerar el proceso de lesión neural como una interacción de influencias genéticas y ambientales con las características fisiológicas intrínsecas de las poblaciones de neuronas afectadas, que incluyen, su sensibilidad a las lesiones excitotóxicas, las variaciones regionales en la capacidad para el metabolismo oxidativo, y la generación de radicales libres tóxicos como productos del metabolismo celular, entre otros.

Todos estos factores que entrañan vulnerabilidad selectiva pueden resultar objetivos importantes para los agentes neuroprotectores, con el propósito de retrasar o impedir el progreso de los trastornos neurodegenerativos.

El objeto del presente trabajo de tesis fue explorar el potencial neuroprotector de un agente farmacológico conocido, la lidocaína, frente a la lesión excitotóxica ocasionada por el ácido kaínico en las poblaciones celulares de la médula espinal de rata. En esta introducción, se expondrán brevemente las generalidades del SNC normal y de la médula espinal en particular. Seguidamente, se reseñarán

las principales lesiones que este sistema puede sufrir, con especial interés en las enfermedades neurodegenerativas y las lesiones por excitotoxicidad. Finalmente, se describirán las principales características de los anestésicos locales en general, y de la lidocaína en particular.

1.1 Sistema Nervioso Central

Todos los organismos vivos deben ser capaces de reaccionar apropiadamente a los cambios que se producen en su entorno para poder sobrevivir. Las funciones normales del organismo dependen de la recepción de estímulos desde el ambiente externo y propios, y de la generación de reacciones integradas dirigidas en respuesta. La regulación de estas reacciones es responsabilidad del sistema nervioso. Anatómicamente, la organización general del sistema nervioso comprende dos grandes divisiones: sistema nervioso central (SNC) y, sistema nervioso periférico (SNP). En esta introducción, nos abocaremos a la descripción del SNC.

1.1.1 Desarrollo y formación

El SNC es una estructura tubular originada de la proliferación de las células epiteliales del ectodermo. El primordio del SNC se visualiza como un engrosamiento del ectodermo a lo largo de la línea media, denominado placa neural. Durante el posterior desarrollo, se crea un surco medio o surco neural. Los bordes dorsales del surco se fusionan para formar un tubo, el tubo neural, que después del cierre se separa del resto del ectodermo. Rostralmente, el tubo neural se ensancha para formar el encéfalo, mientras que caudalmente, el resto forma la médula espinal (Brüel *et al.*, 2015). Antes del cierre completo las aperturas rostral y caudal se denominan neuróporo rostral y caudal,

respectivamente (de Lahunta & Glass, 2009) (**Fig. 1.1**). Una vez que el tubo neural se desarrolló en un encéfalo y una médula espinal rudimentarios, comienza la generación y la diferenciación de los elementos celulares permanentes del encéfalo: las neuronas y la glía.

En la primera etapa del desarrollo de la pared del tubo neural, las células del neuroectodermo se organizan en forma pseudoestratificada, por lo que el tubo neural tiene una célula de espesor. La membrana celular de cada célula ocupa el ancho total del tubo neural, pero los núcleos se ubican en varios niveles en cada célula. Todas estas células son mitóticamente activas e incrementan el espesor de la pared del tubo. El núcleo migra dentro del citoplasma de cada célula y su posición depende de la etapa celular de mitosis. La diferenciación ocurre en la superficie externa del tubo neural. Por lo tanto, en un corto tiempo, aparece una nueva capa de células diferenciadas en la cara externa de la capa en división activa. La capa de células mitóticas es la capa germinal (de Lahunta & Glass, 2009).

Las células progenitoras del tubo neural se conocen como células precursoras neurales (Purves *et al.*, 2004). Las células diferenciadas pueden ser de dos tipos: neuronas inmaduras y espongiblastos (**Fig. 1.2**). Las neuronas inmaduras son las células parenquimales primarias del sistema nervioso y se denominan neuroblastos. Las neuronas diferenciadas inmaduras crecen en extensión, formando largas prolongaciones para convertirse en células maduras y funcionales. Los espongiblastos son los progenitores de las células de soporte del sistema nervioso, la neuroglia. Tres formas de células gliales derivan de estos espongiblastos: astrocitos (fibrosos y protoplasmáticos) y oligodendrocitos. El tercer tipo de célula glial es la microglía, que tiene origen mesodérmico y que ingresa al sistema nervioso a través del soporte sanguíneo.

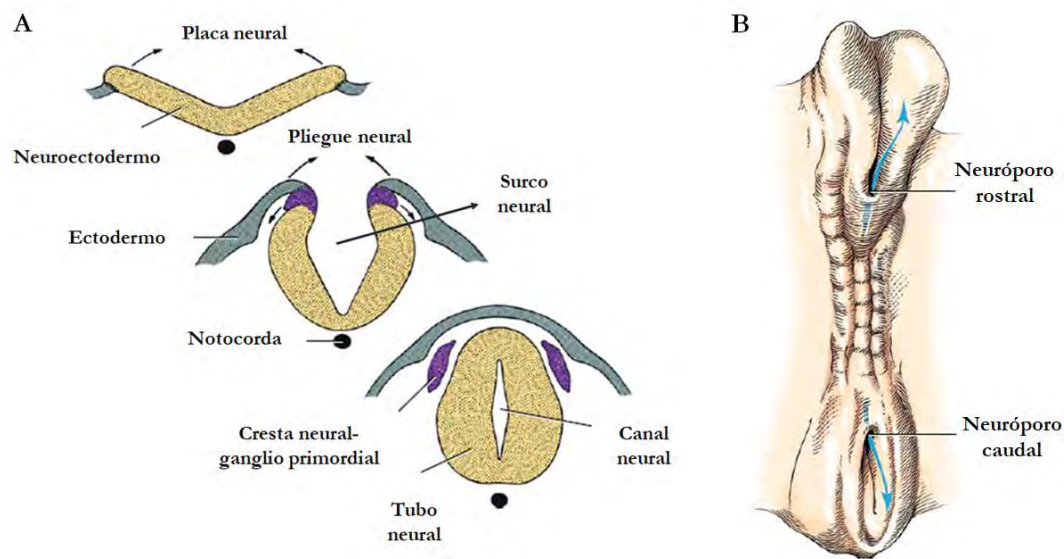


Figura 1.1. A- Sección transversal esquemática del cierre del tubo neural. B- Vista dorsal esquemática del cierre del tubo neural. Se indica la posición de los neuróporos rostral y caudal. Modificado de [de Lahunta & Glass, 2009](#).

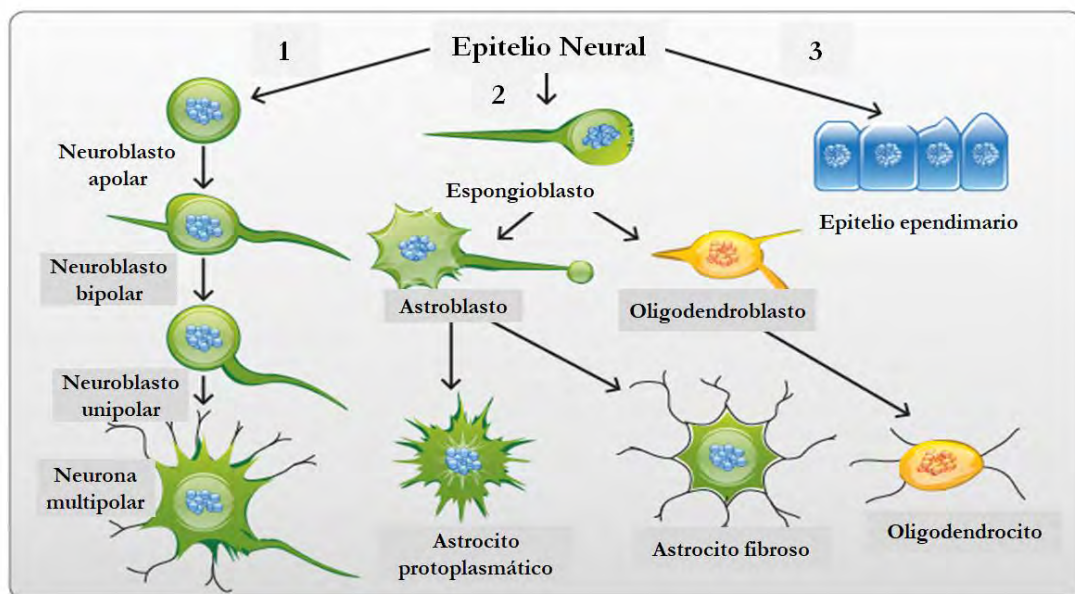


Figura 1.2. Esquema que representa las diferentes poblaciones celulares surgidas a partir del epitelio neural. Modificado de: <http://endocrinologiaginecologica.blogspot.com/2012/05/sistema-nervioso-central.html>

A medida que las neuronas y los espongioblastos se diferencian y crecen y las neuronas producen prolongaciones, el tubo neural se organiza en tres capas concéntricas (**Fig. 1.3**). El tubo neural primario está compuesto por una única

capa de células neuroepiteliales cilíndricas. Hacia la luz del tubo neural, la capa germinal de células neuroepiteliales en proliferación está limitada por una membrana basal denominada membrana limitante interna. Hacia el exterior se encuentra una membrana equivalente, la membrana limitante externa. Las células neuroepiteliales de la capa presentan proliferación activa y la capa se transforma en pseudoestratificada, pero está compuesta por un solo tipo de células, que se extiende con forma de huso a través de toda la capa, con el núcleo ubicado en posición central. Durante la mitosis, el núcleo adopta una forma más redondeada y migra hacia la parte basal de la célula. Esta actividad mitótica se extinguirá, finalmente, reduciendo la capa germinal a una sola capa de células, las células endocitiales, que se alinean en todo el lumen del tubo neural. Estas células se encuentran a lo largo del sistema ventricular del cerebro y el canal central de la médula espinal ([de Lahunta & Glass, 2009](#)). Después de la división, a comienzos del período de proliferación, algunas de las células recién formadas migran hacia el exterior para establecer una nueva capa, la zona intermedia o capa del manto, mientras que la capa interna original, donde tienen lugar las continuas divisiones, ahora se denomina zona ventricular.

Las células neuroepiteliales también dan origen a las células progenitoras basales, que forman una nueva zona justo por fuera de la zona ventricular, la zona subventricular, que separa la zona ventricular de la zona intermedia. Las células de la zona subventricular continúan el proceso de división y dan origen a las neuronas y las células de la neuroglia, que migran hacia la zona intermedia. Antes de la creación de la zona subventricular, aparece una zona periférica a la intermedia, denominada zona marginal, compuesta por axones en crecimiento provenientes de la zona intermedia y de células de la neuroglia ([Brüel et al., 2015](#)).

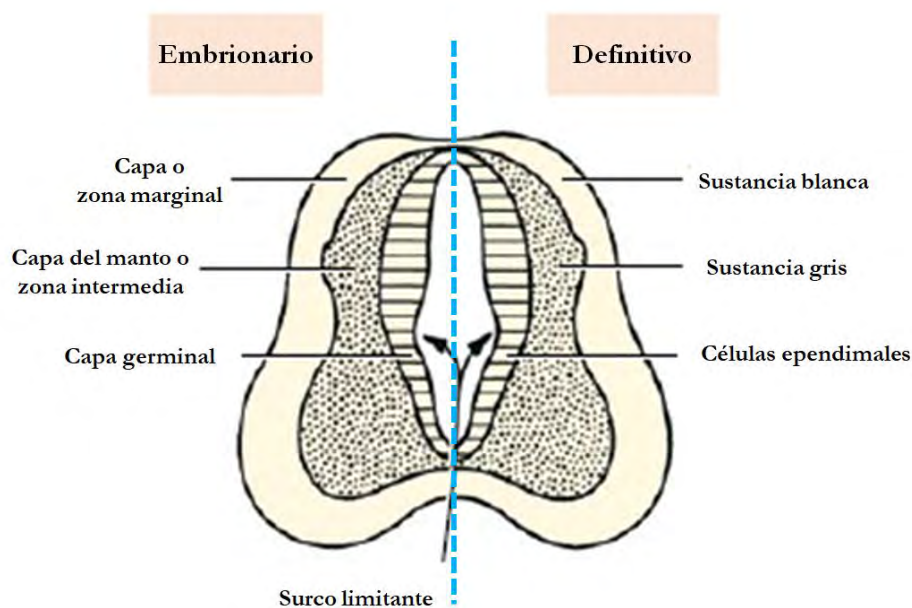


Figura 1.3. Representación esquemática de la organización en capas del tubo neural durante el desarrollo embrionario (izquierda) y su correlación con las estructuras definitivas en el organismo adulto (derecha). Modificado de [de Lahunta & Glass, 2009](#).

Más tarde, la zona marginal se transforma en sustancia blanca a medida que los axones en crecimiento se mielinizan ([Brüel *et al.*, 2015](#)), mientras que la zona intermedia pasa a ser la sustancia gris de la médula espinal definitiva, los núcleos del tallo cerebral, los núcleos y la corteza del cerebelo, y los núcleos basales y la corteza cerebral del telencéfalo ([de Lahunta & Glass, 2009](#)).

La proliferación de neuroblastos en la zona del manto produce un gran engrosamiento ventral y uno dorsal más pequeño a cada lado del tubo neural. Estos engrosamientos se llaman placas basal y alar, respectivamente, y el borde entre ellos se encuentra delimitado por un surco poco profundo, el surco limitante (**Fig. 1.4**). La placa basal contiene neuroblastos que luego se convierten en neuronas motoras, mientras que muchos neuroblastos de la placa alar se convertirán en neuronas sensoriales. Esto corresponde a la división funcional entre las astas ventrales y dorsales de la médula ([Brodal, 2010](#)).

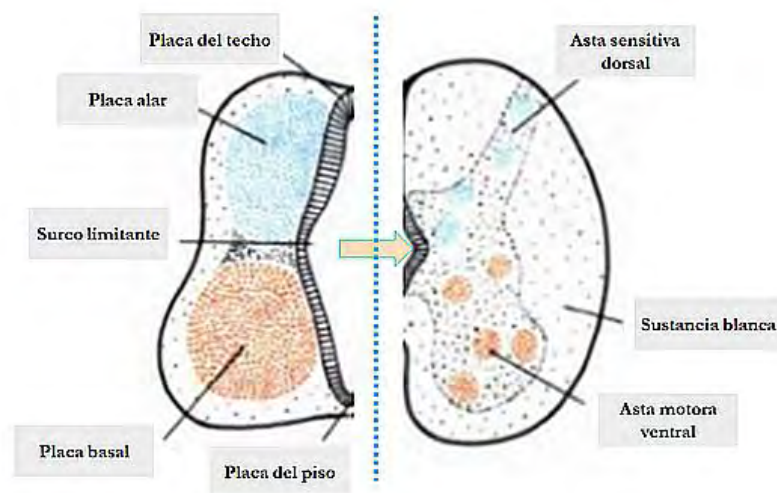


Figura 1.4. Esquema de la distribución de las diferentes placas y su correspondiente evolución hacia neuronas motoras o sensitivas. Modificado de: <https://es.slideshare.net/divarocha2004/embriologia-del-sistema-nervioso-15093567>

Las células del tubo neural, que se encuentran en la línea media ventral, se diferencian en células que parecen epiteliales y se denominan placa del piso. La posición de la placa del piso en la línea media ventral determina la polaridad dorsoventral del tubo neural e influye, además, en la diferenciación de las células precursoras neurales. Las señales inductivas conducen a la diferenciación de las células en la porción ventral del tubo neural, que finalmente dan origen a las neuronas motoras de la médula espinal y el encéfalo posterior (que se encuentran así más cerca de la línea media ventral). Las células precursoras más alejadas de la línea media ventral con el tiempo dan origen a las neuronas de relevo sensitivo en el interior de la médula espinal y el encéfalo posterior (Purves *et al.*, 2004).

1.1.2 Células del sistema nervioso

El sistema nervioso está compuesto por células funcionales, las **neuronas** y las células de soporte, que incluyen a las células de la glía y al epéndimo (de Lahunta & Glass, 2009). Las células de la glía son más abundantes que las neuronas, más

pequeñas que estas y carecen de axones y dendritas (Purves *et al.*, 2004). Entre estas se diferencian **astrocitos**, **oligodendrocitos** (en conjunto denominados macroglía) y **macrófagos** (microglía) (Brüel *et al.*, 2015).

1.1.2.1 Neuronas

Las neuronas están formadas por un cuerpo celular, llamado **pericarion**, que contiene al núcleo y varias prolongaciones. Las prolongaciones, que pueden variar en longitud, número y formas, son de dos tipos y se distinguen por la dirección en que transmiten los impulsos: la **dendrita**, que habitualmente es múltiple y transmite los impulsos hacia el pericarion y el **axón**, que siempre es único en su origen y transmite impulsos desde el pericarion hacia la periferia. Por esta razón se dice que la célula nerviosa está polarizada. El telodendron es la terminación de la neurona, donde el impulso abandona la neurona. El cuerpo celular contiene el núcleo y las principales organelas necesarias para el funcionamiento, y puede ubicarse en cualquier sitio a lo largo del axón (de Lahunta & Glass, 2009). La disposición de las prolongaciones permite una clasificación morfológica simple de las neuronas. La mayoría son **multipolares** y poseen un elevado número de dendritas arborizadas que se unen al pericarion en sitios diversos (**Fig. 1.5**); las **bipolares**, tienen dendritas que se unen en un tronco común antes de alcanzar el pericarion, en un sitio distante del origen del axón y las **unipolares** o **pseudounipolares**, tienen el árbol dendrítico y el axón inicialmente combinados en una extensión única del pericarion, que ulteriormente se ramifica (Dyce & Molenaar, 1999).

La interacción funcional entre neuronas ocurre en regiones anatómicamente identificables, denominadas sinapsis (**Fig. 1.6A**). Actualmente, se reconocen dos modalidades principales de transmisión sináptica: química y eléctrica. La sinapsis química, requiere la liberación de neurotransmisores desde una neurona y la detección de ese neurotransmisor por una neurona adyacente; mientras que,

en la sinapsis eléctrica el citoplasma de células adyacentes se conecta directamente por canales intercelulares denominados *uniones gap* (Pereda, 2014).

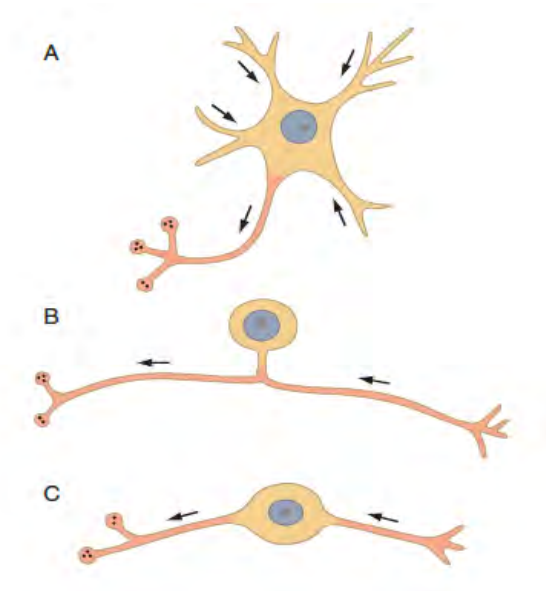


Figura 1.5. Esquematación de diferentes tipos de neuronas. **A-** Neurona multipolar. **B-** Neurona pseudounipolar. **C-** Neurona bipolar. El sentido de las flechas indica la dirección de los impulsos. Extraído de Brodal, 2010.

Aunque las especializaciones celulares para ambas formas de transmisión pueden hallarse en varios sitios de la neurona, la transmisión química normalmente ocurre entre las terminales sinápticas de los axones y la dendrita o soma de una segunda neurona, ganglio nervioso o fibra muscular. El impulso nervioso (potencial de acción), que llega a la terminal presináptica de un axón, desencadena una de dos respuestas en la terminal pos-sináptica: despolariza la membrana, iniciando un nuevo impulso que se propaga a lo largo de la célula pos-sináptica o hiperpolariza la membrana, produciendo un bloqueo o efecto inhibitorio (**Fig. 1.6B**). La existencia de ambos tipos de sinapsis, incluso dentro de una misma célula, da lugar a múltiple variedad de respuestas (Dyce & Molenaar, 1999).

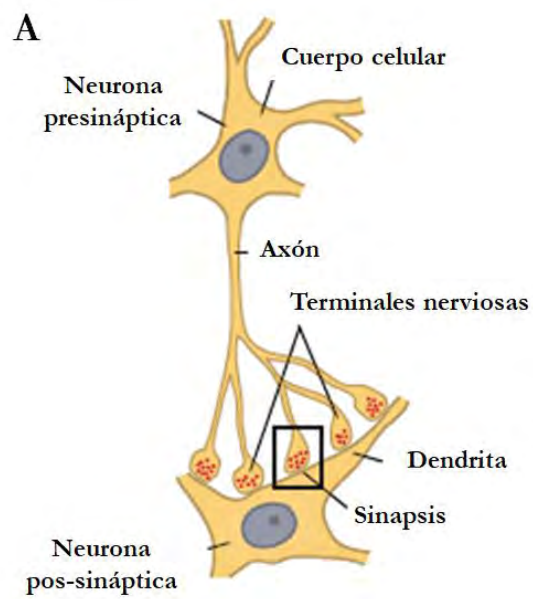


Figura 1.6. A- Esquema general de neuronas pre y postsinápticas. Adaptado de [Brodal, 2010](#).

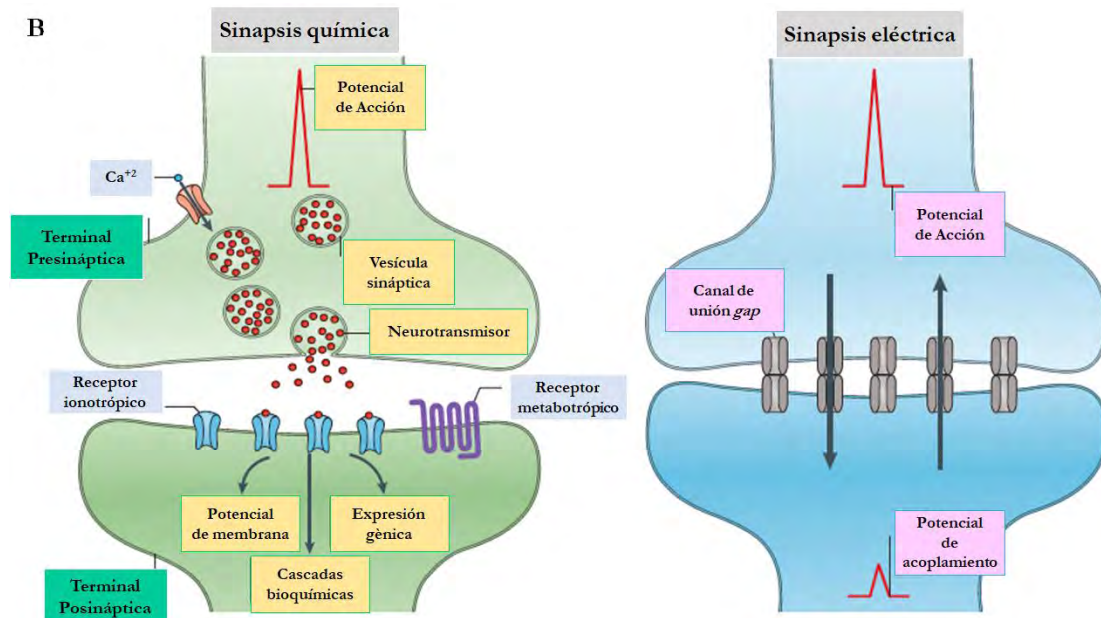


Figura 1.6. B. Principales elementos estructurales de las sinapsis químicas y eléctricas. Modificado de [Pereda, 2014](#).

1.1.2.2 Astrocitos

Son células con forma de estrella y numerosas prolongaciones citoplasmáticas. Algunas de esas prolongaciones se hallan en contacto con vasos sanguíneos en la forma de *pies perivasculares* característicos (**Fig. 1.7**). El citoplasma de los astrocitos contiene numerosos filamentos de tipo intermedio, compuestos por proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y gránulos de glucógeno.

Los astrocitos fibrosos, se encuentran mayoritariamente en la sustancia blanca, tienen un mayor contenido de filamentos intermedios y presentan menos prolongaciones más largas y menos ramificadas que el otro tipo de astrocitos. Los astrocitos protoplasmáticos, se hallan fundamentalmente en la sustancia gris y poseen prolongaciones de formas muy variables (Brüel *et al.*, 2015).

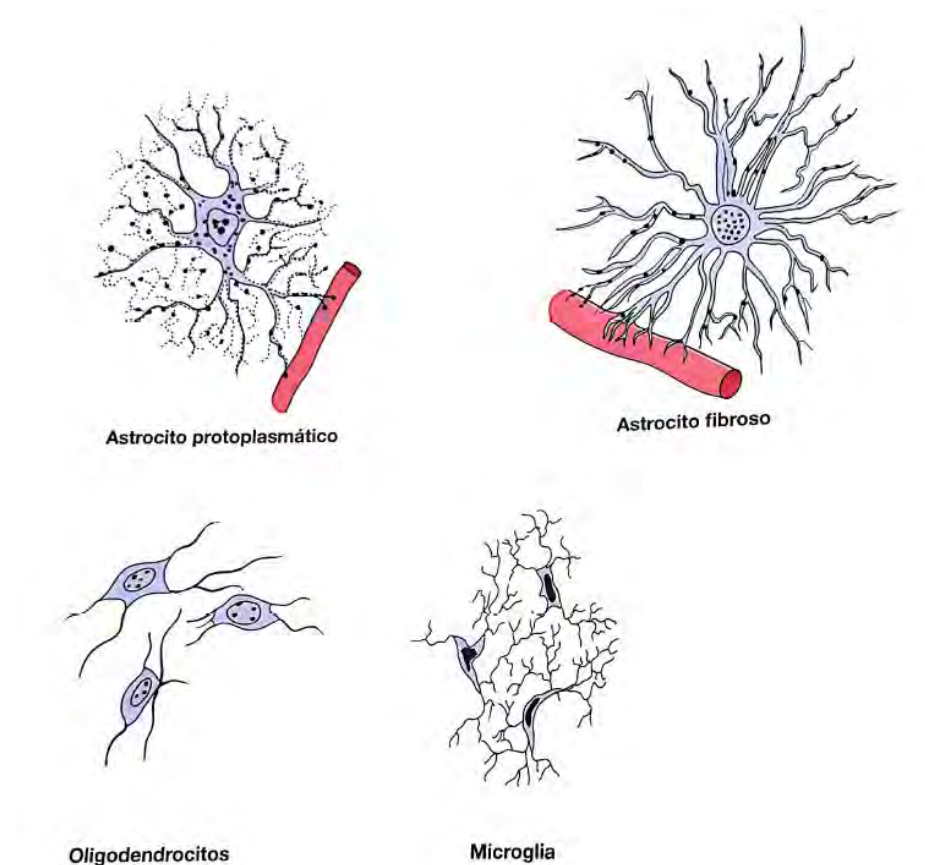


Figura 1.7. Representación esquemática de las principales células de la neuroglia: astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Modificado de Brüel *et al.*, 2015.

Todos los astrocitos intervienen en forma activa en la interacción funcional con las neuronas, y si bien carecen de capacidad para generar potenciales de acción, se comunican a través de señales químicas. Son estimulados en forma no eléctrica por las sustancias liberadas en las sinapsis de las neuronas, dado que poseen receptores para diversos transmisores y neurohormonas, y liberan sustancias que influyen sobre la actividad de las neuronas (Brüel *et al.*, 2015). Las prolongaciones de un solo astrocito pueden asociarse a más de un millón de sitios sinápticos y se comunican con las otras células de la neuroglia mediante nexos y uniones gap (Mescher, 2016). A modo de ejemplo, en la liberación de glutamato desde las terminaciones glutamatérgicas, el mecanismo principal para la eliminación de glutamato de la hendidura sináptica es la captación del transmisor por los astrocitos. Al mismo tiempo, estos astrocitos son estimulados para transformar el glutamato captado en glutamina, que vuelve a liberarse y luego es captada por la terminación nerviosa, donde se transforma en glutamato. La neurona no es capaz de sintetizar la glutamina y, por lo tanto, requiere la enzima glutamina sintetasa específica de los astrocitos. Los astrocitos también tienen capacidad para captar el GABA liberado en la sinapsis, para transformarlo en glutamina y para producir lactato por degradación glucolítica de glucosa (Brüel *et al.*, 2015).

Ante la lesión del tejido nervioso, los astrocitos aumentan la captación de iones y los neurotransmisores filtrados de las neuronas dañadas. También son las células cicatrizales del sistema nervioso. Durante la cicatrización, ocupan los defectos tisulares creados y se hacen más ricas en fibras (Brüel *et al.*, 2015). Además, se cree que regulan las concentraciones iónicas extracelulares en los alrededores de las neuronas, con particular influencia e importancia en el mantenimiento de los niveles extracelulares de K^+ (Mescher, 2016).

1.1.2.3 Oligodendrocitos

Poseen un cuerpo celular más pequeño, menos prolongaciones y menos ramificaciones que los astrocitos (**Fig. 1.7**). No contienen filamentos ni gránulos de colágeno (Brüel *et al.*, 2015). Son las células gliales predominantes en la sustancia blanca (Mescher, 2016).

Los oligodendrocitos satélites se hallan adosados al cuerpo de las neuronas de la sustancia gris, mientras que los oligodendrocitos interfasciculares se encuentran mayoritariamente en la sustancia blanca en la forma de hileras entre las fibras nerviosas (Brüel *et al.*, 2015).

Estas células extienden sus prolongaciones de modo que cada una de ellas adopta una forma similar a una hoja y se envuelve repetidamente alrededor de una sección de un axón cercano. Durante ese proceso, la mayor parte del citoplasma se mueve en forma gradual fuera de la creciente extensión, dejando finalmente múltiples capas compactadas de membrana celular llamadas colectivamente: mielina. La longitud total de un axón es cubierta por acción de muchos oligodendrocitos. Esa vaina de mielina resultante aísla eléctricamente el axón y facilita la transmisión rápida de los impulsos nerviosos (Mescher, 2016).

1.1.2.4 Microglía

Son células pequeñas con un núcleo reducido y oscuro, y delgadas prolongaciones con finas espinas (**Fig. 1.7**). Estas células se hallan en todo el SNC y son más numerosas en la sustancia gris (Brüel *et al.*, 2015). A diferencia de las otras células gliales, la microglía migra, sus prolongaciones exploran y eliminan las sinapsis dañadas (Mescher, 2016).

Se originan a partir de monocitos sanguíneos circulantes. Ante el daño del tejido nervioso, los microgliocitos residentes pueden transformarse en microgliocitos reactivos, con fagocitosis activa, que actúan como células presentadoras de antígeno. Las células microgliales son las primeras que reaccionan minutos

después de una lesión del SNC, con divisiones celulares, cambios morfológicos y liberación de citocinas (Brüel *et al.*, 2015). Constituyen el principal mecanismo de defensa inmune en el SNC (Mescher, 2016). La activación es gradual, de modo que la respuesta se adapta al daño. La microglía también produce varios factores neurotróficos, que sustentan la supervivencia de las neuronas (Brüel *et al.*, 2015).

1.1.2.5 Células endoteliales

Se denomina endotelio al epitelio simple cúbico que reviste la superficie interna de los ventrículos cerebrales y el conducto central de la médula espinal. Las membranas laterales de las células se encuentran unidas en la porción sub-apical por medio de nexos y desmosomas dispersos, salvo en el revestimiento endotelial del plexo coroideo. No existe un cierre completo del espacio intercelular en forma de contactos oclusivos. Además, tampoco existe una membrana basal interpuesta entre las células endoteliales y el tejido nervioso subyacente, lo cual significa que el espacio intercelular del tejido nervioso se comunica libremente con el líquido cefalorraquídeo (LCR) ventricular. Esto permite el pasaje de líquido, y hasta de pequeñas moléculas proteicas, a través de las células (Brüel *et al.*, 2015). El revestimiento endotelial del plexo coroideo presenta características especiales, puesto que las células, denominadas tanicitos, tienen largas prolongaciones que se extienden hacia el interior del tejido encefálico hasta la piamadre, donde terminan formando pies similares a los de los astrocitos (Brüel *et al.*, 2015).

1.1.3 Médula espinal

El sistema nervioso se divide, anatómicamente y funcionalmente, en dos partes: el sistema nervioso central (SNC) (**Fig. 1.8**), que consiste en el cerebro y la médula

espinal y, el sistema nervioso periférico (SNP), compuesto por nervios craneales y espinales y sus ganglios nerviosos asociados (Greenstein & Greenstein, 2000). La médula espinal es una estructura elongada, más o menos cilíndrica, localizada en el conducto raquídeo (Purves *et al.*, 2004), que se continúa, hacia craneal, con la médula oblonga y que se extiende desde el *foramen magnum* hasta el borde inferior de la primera vértebra lumbar (Fig. 1.9) (Greenstein & Greenstein, 2000). La médula presenta un aplanamiento dorsoventral discreto, dos engrosamientos (de las partes que dan origen a los nervios para las extremidades torácicas y pelvianas), y el estrechamiento caudal final. En la rata, los dos engrosamientos se observan en animales jóvenes, mientras que en animales envejecidos el engrosamiento cervical pasa desapercibido, debido al engrosamiento general de la médula a ese nivel (Portiansky *et al.*, 2004).

Existe una relación ordenada entre la localización de los grupos de neuronas motoras y los músculos que inervan; por lo tanto, los grupos de neuronas motoras que inervan los miembros torácicos se localizan en el ensanchamiento cervical de la médula espinal y los que inervan los miembros caudales, en el ensanchamiento lumbar (Purves *et al.*, 2004). Asimismo, la médula está dividida en segmentos o regiones: cervical, torácica, lumbar, sacra, y coccígea.

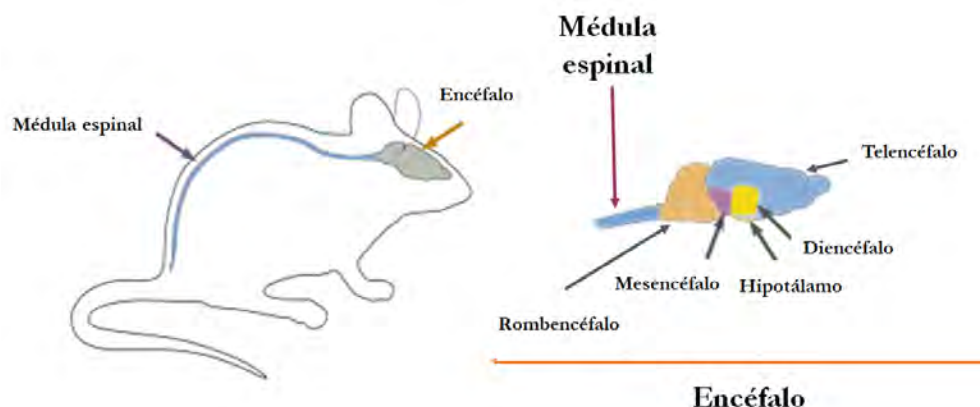


Figura 1.8. Representación esquemática de la organización del sistema nervioso central de la rata. Modificado de (https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_01snc.php).

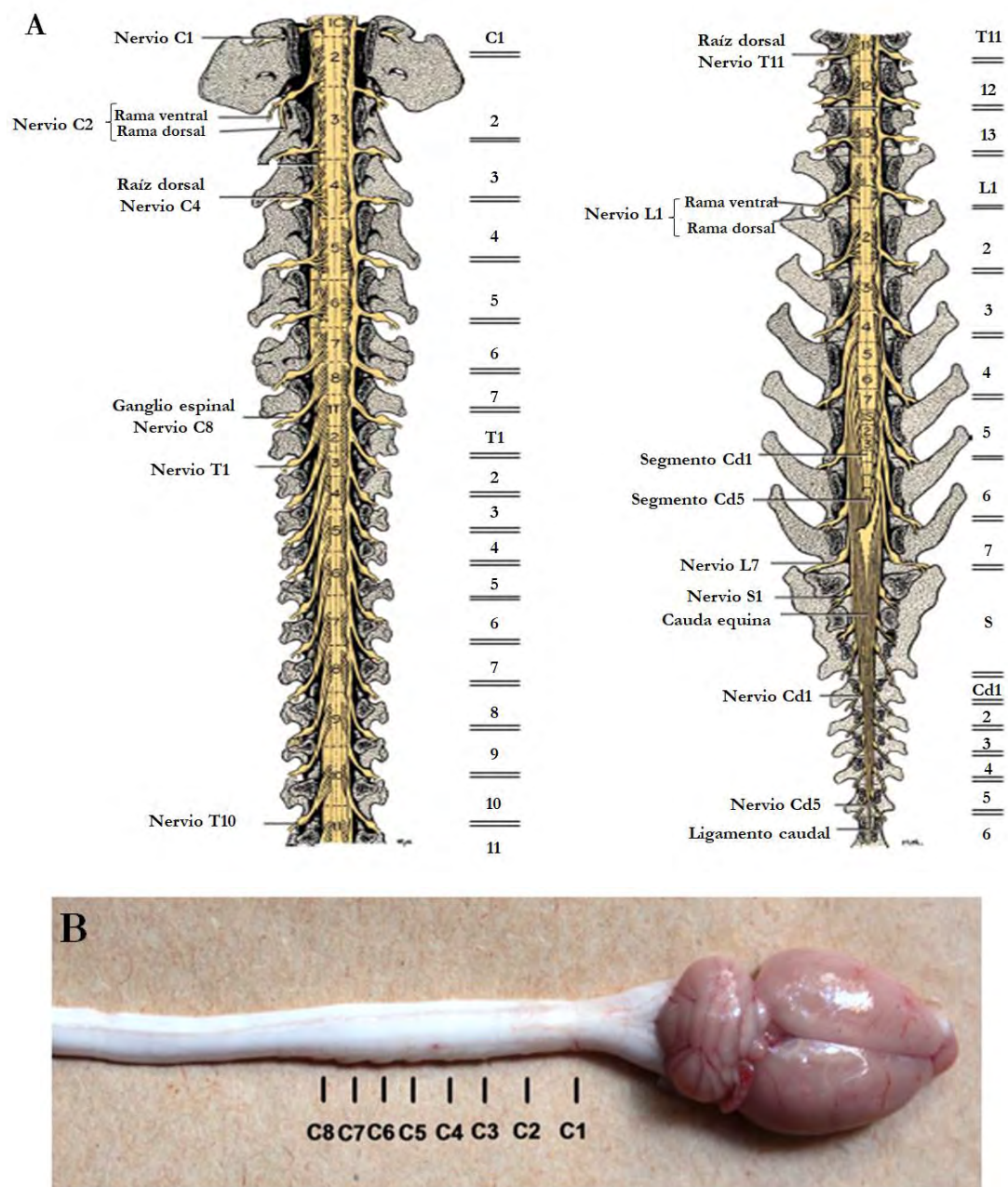


Figura 1.9. A- Relación de los segmentos y los cuerpos vertebrales en la médula espinal de perro. Desde C1 a T11 (izquierda) y desde T11 hasta los segmentos caudales (derecha); la médula espinal, las raíces, los ganglios y los nervios se han expuesto mediante la eliminación de los arcos vertebrales. Los números a la derecha representan los niveles de los cuerpos vertebrales. Modificado de [Evans, 1993](#). **B-** Fotografía de una médula espinal de rata, en la que se indica la ubicación de los segmentos cervicales. Extraída de [Nishida et al., 2014a](#).

La sección transversal de la médula espinal muestra la sustancia gris central, dispuesta en forma similar a una H y perforada en la línea media por un pequeño canal central, vestigio de la luz del tubo neural embrionario, el cual se conecta, a su vez, al menos en la rata, con el cuarto ventrículo ([Nishida *et al.*, 2011](#)). La sustancia gris posee columnas o astas dorsal y ventral. Su tono gris se debe al acúmulo, en esta zona, de los somas neuronales y de gran cantidad de fibras nerviosas amielínicas (**Fig. 1.10**). El asta dorsal contiene las neuronas aferentes somáticas situadas en su porción dorsomedial, y las neuronas aferentes viscerales situadas en la porción ventrolateral. El asta ventral está compuesta por las neuronas eferentes somáticas, que se localizan ventralmente, y las neuronas eferentes viscerales que forman un asta lateral adicional, que sólo está presente en las regiones toracolumbar y sacra de la médula. Las neuronas de cada una de las astas se agrupan, más específicamente, de acuerdo con sus asociaciones funcionales y topográficas, pero esto no se distingue macroscópicamente. La mayoría de las neuronas que inervan los músculos esqueléticos del cuerpo se localizan en el asta ventral de la médula espinal. Cada neurona inerva las fibras musculares en el interior de un único músculo y todas las neuronas motoras que inervan un único músculo se agrupan y discurren paralelas al eje mayor de la médula espinal durante uno o más segmentos medulares ([Purves *et al.*, 2004](#)).

La sustancia gris se halla rodeada por sustancia blanca, a la que se divide, arbitrariamente, en columnas o funículos dorsal, lateral y ventral ([Greenstein & Greenstein, 2000](#)). El funículo dorsal se sitúa entre el surco dorsal, poco marcado y que se prolonga en profundidad por un septo glial medio, y el punto de origen de las raíces dorsales de los nervios espinales; el funículo lateral se sitúa entre las raíces ventrales y dorsales; el funículo ventral entre la salida de las raíces ventrales y la fisura ventral que penetra profundamente en la sustancia

blanca, aunque dejando una amplia comisura, que conecta las mitades derecha e izquierda.

Los funículos se componen de fibras nerviosas ascendentes y descendentes, muchas de ellas agrupadas en haces (fascículos o tractos) de origen, destino y función comunes.

Los diferentes niveles de la médula espinal muestran variaciones en cuanto a forma y tamaño, de la cantidad relativa de sustancias gris y blanca, y en la disposición y configuración de la sustancia gris. Los segmentos medulares cervicales contienen el mayor número de fibras en la sustancia blanca porque los sistemas de fibras descendentes no han contribuido aún con los niveles segmentarios caudales, y los sistemas de fibras ascendentes aumentan sucesivamente en cada segmento rostral. Las columnas grises alcanzan su grosor máximo en los engrosamientos cervical y lumbar, asociados con los principales nervios más importantes que inervan las extremidades. Los segmentos lumbosacros contienen gran cantidad de sustancia gris, en relación con el tamaño de los segmentos medulares y con la cantidad de sustancia blanca (Carpenter & Sutin, 1990a).

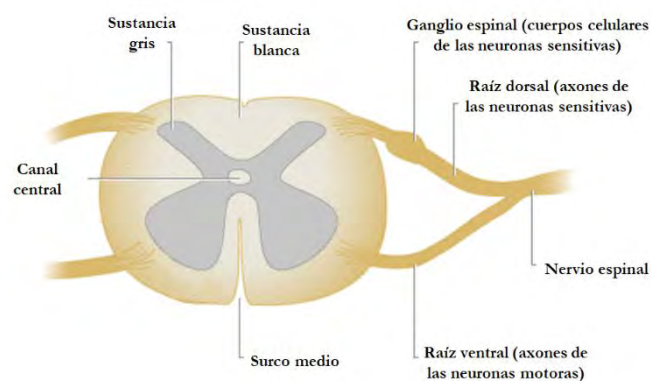


Figura 1.10. Esquema de una sección transversal de la médula espinal. Se observan las astas dorsal y ventral de la sustancia gris, el canal central (conducto del epéndimo), las raíces dorsal y ventral, y un ganglio espinal. Tomada de <https://chiariargentina.jimdo.com/sistema-nervioso-central/>.

Los nervios periféricos que inervan la mayor parte del cuerpo surgen de la médula espinal como pares de nervios espinales segmentarios. La información sensitiva que traen los axones aferentes de los nervios periféricos ingresa a la médula espinal a través de las raíces dorsales, mientras que las órdenes motoras transmitidas por los axones eferentes abandonan la médula espinal a través de las raíces ventrales. Los axones (fibras nerviosas) salen de y entran a la médula en pequeños paquetes llamados raicillas. Varias raicillas adyacentes se unen en una hebra más gruesa, llamada raíz nerviosa. De esta manera, se forman filas de raíces a lo largo de las astas dorsal y ventral de la médula: las raíces dorsales y las raíces ventrales, respectivamente. Cada raíz dorsal tiene un engrosamiento, el ganglio espinal, que contiene los cuerpos celulares de los axones sensoriales que entran en la médula a través de la raíz dorsal ([Brodal, 2010](#)).

Los ganglios son estructuras ovoides rodeadas por una cápsula de tejido conectivo que emite trabéculas hacia el interior del ganglio y forma un estroma muy vascularizado. Cada neurona ganglionar está rodeada por una capa de células satélite (células de Schwann) de estructura aplanada. Los cuerpos de las neuronas de los ganglios (neuronas pseudounipolares) sólo tienen por función recibir la información sensitiva de la periferia del individuo y retransmitirla al interior de la médula ([Brüel et al., 2015](#)).

Otro grupo de neuronas que envía sus axones fuera de la médula a través de la raíz ventral son las llamadas neuronas motoras autónomas, que inervan el músculo liso y las glándulas. Estas neuronas pertenecen al sistema nervioso autónomo y se denominan preganglionares, porque envían sus axones a un ganglio (paravertebral). La mayoría de estos ganglios forma una columna larga y delgada (columna celular intermediolateral), que solo está presente en los segmentos torácicos y los dos primeros segmentos lumbares de la médula. Estos ganglios pertenecen a la división simpática del sistema nervioso autónomo ([Brodal, 2010](#)).

Una vez que las raíces se unen, los axones sensitivos y motores viajan juntos en los nervios espinales segmentarios, que abandonan la médula espinal (o ingresan a esta) a través de los agujeros intervertebrales, que se ubican adyacentes al cuerpo vertebral de numeración respectiva (Purves *et al.*, 2004) (**Fig. 1.11**). Los nervios espinales se nombran de acuerdo con el punto de surgimiento en la médula espinal, mediante una letra que indica la región de origen (cervical (C), torácica (T), lumbar (L), sacra (S), caudal o coccígea (Cd)) y un número que denota el orden correspondiente. Los nervios espinales brotan dorsalmente a la vértebra que les da nombre para las primeras siete vértebras y a partir de entonces, surgen ventralmente a la vértebra correspondiente.

En la rata estos nervios se agrupan en pares de 8 nervios cervicales (C1 a C8), 13 torácicos (T1 a T13), 6 lumbares (L1 a L6), 4 sacros (S1 a S4) y 3 caudales o coccígeos (Cd1 a Cd3) (Paxinos, 2004).

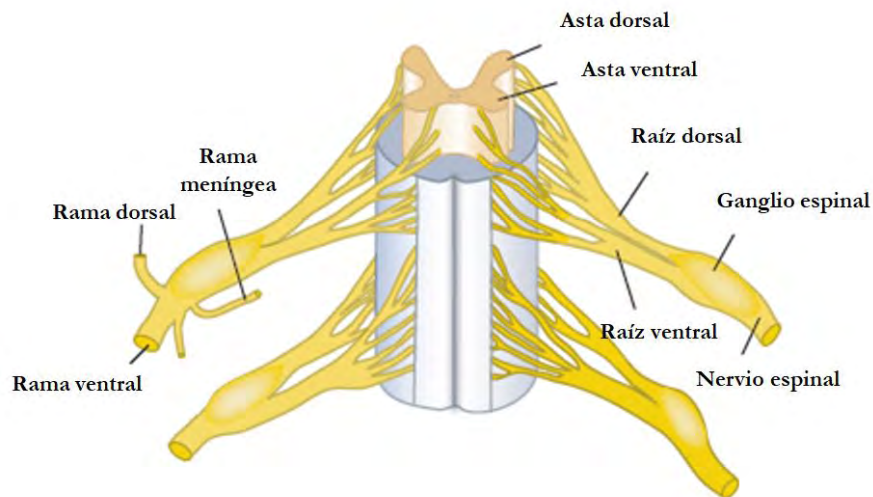


Figura 1.11. Dos segmentos de la médula espinal, vistos desde ventral. La sustancia blanca de la porción dorsal se ha eliminado. Se observa la emergencia de las raíces dorsal y ventral desde las astas dorsal y ventral, respectivamente, y su unión para formar los nervios espinales. En el sitio en que las raíces se unen, se halla el ganglio espinal. Modificado de Brodal, 2010.

La médula espinal es considerablemente más pequeña que el canal vertebral, incluso cuando se considera su revestimiento meníngeo. A diferencia de las ratas jóvenes, en las ratas envejecidas la médula ocupa prácticamente todo el espacio del canal vertebral (Nishida *et al.*, 2011; 2014b). Asimismo, es considerablemente más corta, debido al crecimiento retrasado y desigual de la médula espinal con respecto a la columna vertebral, una desproporción que comienza antes del nacimiento y continúa después de él. Este cambio relativo en la posición desplaza, desde sus posiciones originales en dirección craneal, a los segmentos de la médula con respecto a las vértebras de la misma designación numérica. El desplazamiento de los segmentos más caudales es más pronunciado, por lo que estos van teniendo unos trayectos progresivamente más largos dentro del canal hasta alcanzar sus agujeros fijos de salida, formando una especie de escobilla (que se conoce como la cauda equina) a cada lado del cono medular (*conus medullaris*) (Dyce & Molenaar, 1999).

1.1.3.1 Citoarquitectura de la médula espinal

Originalmente, Rexed describió la organización arquitectónica de las neuronas de la médula espinal del gato, que gradualmente fue aceptada como patrón. En general, se acepta que en todos los mamíferos superiores existe una laminación similar (Carpenter & Sutin, 1990a).

La sustancia gris de la médula espinal se divide en 10 regiones citoarquitectónicas, nueve Láminas celulares definidas en casi todos los segmentos que están representados por números romanos, las Láminas I a IX y un área alrededor del canal central, área X, que aparece en forma bastante uniforme a lo largo de toda la médula (**Fig. 1.12**). Los límites entre las diferentes regiones no son fijos, sino que deben considerarse como zonas de transición. A continuación, se exponen las principales características de las mencionadas

Láminas, según [Carpenter & Sutin, 1990a](#); [Grant & Robertson, 2004](#); [Grant & Koerber, 2004](#).

Lámina I: también llamada zona marginal. Forma una especie de delgado borde alrededor de los márgenes dorsal y dorsolateral del asta dorsal. Tiene una apariencia esponjosa y está atravesada por muchos haces fibrosos grandes y pequeños. Las células que contiene son de diverso tamaño, pero nunca superan los 20 μm de diámetro ([Portiansky *et al.*, 2004](#)). Este sector de la sustancia gris medular recibe la mayor cantidad de aferencias. El mayor ingreso de fibras aferentes primarias está provisto por las fibras de tipo A δ , aunque ingresan también algunas fibras cutáneas no mielinizadas de tipo C. Las fibras C son axones no mielinizados, de pequeño calibre, que median sensaciones de dolor. Por su parte, las fibras A δ son axones mielinizados de pequeño calibre que median sensaciones de dolor y temperatura. Si bien no se encuentran presentes en esta Lámina, las fibras A γ , A β y A α son axones mielinizados de mayor calibre que median información postural, de tacto, de presión y motora. Las neuronas de esta Lámina responden específicamente a estímulos térmicos o nociceptivos.

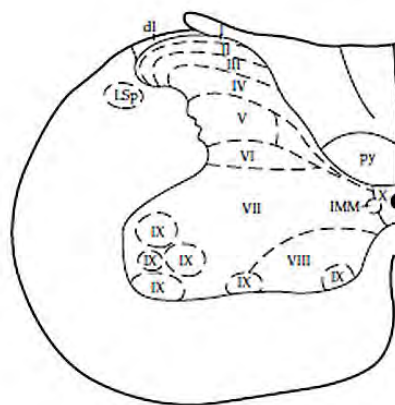


Figura 1.12. Distribución de las diferentes Láminas (I a X) en un corte transversal del segmento C5 de la médula espinal de ratona. Extraído de [Grant & Koerber, 2004](#).

Lámina II: (o sustancia gelatinosa), es subyacente y paralela a la Lámina I. Es más gruesa que esta última y se caracteriza por la predominancia de pequeños cuerpos neuronales con la sustancia de Nissl dispersa, densamente aglutinados. Está cubierta, en su porción dorsal y dorsolateral, por la Lámina I, pero su límite interno es el funículo o cordón posterior. Si bien se halla en todos los segmentos medulares, su espesor es mayor a nivel de los engrosamientos cervical y lumbar. Lo más característico de esta Lámina es la presencia de numerosos axones amielínicos agrupados en fascículos paralelos o perpendiculares al eje mayor de la médula espinal. Los axones grandes y mielínicos, que representan mayormente a fibras de las raíces dorsales, pasan a través de la Lámina II hacia regiones más profundas de la sustancia gris medular. Las fibras mielínicas, a menudo agrupadas en haces, son especialmente comunes en la mitad medial de la Lámina II. Las fibras aferentes a la Lámina II derivan de colaterales en: a) el fascículo dorsolateral, b) el cordón dorsal y c) partes del cordón lateral adyacentes al asta dorsal, los que se describen más adelante. Las fibras que penetran desde el cordón dorsal atraviesan las porciones mediales de las Láminas I y II, penetran partes de las Láminas IV y V, y luego se incurvan dorsal y lateralmente para entrar en la Lámina II por su superficie ventral. Los somas de las neuronas mecanorreceptoras de estímulos inocuos se encuentran en la zona interna de la Lámina II. La mayoría de las neuronas de la Lámina II emiten axones hacia el fascículo dorsolateral, o el fascículo lateral propio adyacente, aunque algunas células dan origen a finos plexos axónicos que permanecen dentro de esta Lámina.

Lámina III: se ubica en posición ventral y paralela con respecto a la Lámina II, con la salvedad de que la curvatura lateral no es tan pronunciada. Tiene una apariencia similar a la Lámina II, pero muestra un rango más amplio de tamaños celulares y es menos compacta. El límite entre las Láminas II y III es bien

definido debido a la presencia de axones pequeños y medianos en la Lámina III, que forman un conglomerado de fibras que corren longitudinalmente. La mayoría de las fibras aferentes primarias de las células de la Lámina III tienen un grosor de intermedio a grueso y siguen un camino curvo para entrar a la parte ventral de la Lámina II. Muchas de las células de esta Lámina responden sólo a estímulos mecánicos débiles y la mayoría de las neuronas de esta Lámina aparecen anatómicamente organizadas como para cumplir la función de interneuronas.

Lámina IV: es más gruesa que las anteriores, forma la cabeza del asta dorsal y se curva ventralmente a lo largo de su borde medial. Se continua con la Lámina contralateral IV en la comisura dorsal a nivel lumbar y sacro y termina en el área X a nivel torácico y cervical. Los bordes de esta Lámina son difusos y sus células varían mucho de tamaño y le dan una apariencia menos compacta que la de la Lámina III. Se destacan, en particular, algunas neuronas muy grandes. Las dendritas de las células de esta Lámina se irradian hacia arriba, penetrando en la sustancia gelatinosa y paralelas a las fibras aferentes primarias. Estas neuronas responden a estímulos de poca intensidad, tales como el tacto suave, y su frecuencia de descarga es paralela a la intensidad del estímulo. Algunas de estas células, junto con otras de las Láminas I y V contribuyen a la formación de los tractos espinotalámicos.

Lámina V: es la capa más ancha del asta dorsal y tiene subdivisiones medial y lateral, excepto en la región torácica. Muchos haces fibrosos pasan a través de la zona lateral y le confieren un aspecto reticulado. La porción lateral da origen a una formación reticular (núcleo reticular), especialmente notable a nivel cervical. Las neuronas de esta zona son más heterogéneas en forma y tamaño que las de la Lámina IV, pero el límite entre una y otra zona es difícil de

distinguir, particularmente en la zona medial. Las dendritas de algunas de las neuronas de esta Lámina se extienden dorsalmente hacia la Lámina II, de la misma manera que lo hacen la mayoría de las células de la Lámina IV. Las fibras de las raíces dorsales establecen sinapsis sobre las dendritas de las células de la Lámina V, que se encuentran en la sustancia gelatinosa. Los sistemas descendentes de las fibras suprasegmentarias (corticoespinales o rubroespinales) parecen establecer contacto sináptico sobre células de la Lámina V y también sobre sus prolongaciones.

Lámina VI: es una capa ancha que forma la base del asta dorsal. Al igual que la Lámina V está dividida en una región medial y otra lateral. Consiste en una banda delgada de neuronas dispuestas en forma compacta. Los límites con las Láminas V y VII son ambiguos. Muchos aferentes musculares de la raíz dorsal del grupo I terminan en la zona medial de la Lámina VI, mientras que las vías descendentes se proyectan hacia las células de la zona lateral. Se ha descrito que las células de esta Lámina responden a estímulos cutáneos y propioceptivos.

Lámina VII: (zona intermedia) se corresponde con la zona intermedia de la sustancia gris y a las partes del asta ventral que no son ocupadas por las Láminas VIII y IX. Tiene una apariencia más clara y homogénea con la tinción de Nissl que las Láminas adyacentes. En algunas regiones, en especial se distinguen columnas celulares bien definidas: los núcleos dorsal, intermediolateral, e intermediomedial. Las grandes células del núcleo dorsal dan origen al haz espinocerebeloso posterior.

Lámina VIII: se ubica en la zona ventral o ventromedial del asta ventral, pero su forma y tamaño difieren en distintos niveles medulares. Tiene una apariencia más heterogénea y generalmente contiene neuronas más grandes que las de

Lámina VII. Esta Lámina constituye una entidad de relevancia, ya que ciertos sistemas de fibras descendentes terminan en las células de esta región.

Lámina IX: consiste en grupos de células que bordean los márgenes laterales y ventrales del asta ventral. Está compuesta por varios grupos diferentes de neuronas motoras somáticas. A nivel de los engrosamientos se observa un mayor número de estas células formando grupos de mayor tamaño. El rango de tamaño de los somas muestra un patrón bimodal, que se presume representado por grandes α -motoneuronas y pequeñas γ -motoneuronas.

Lámina o área X: es el área que rodea al canal central. Bordea la sustancia blanca ventral y dorsalmente, excepto en los niveles lumbosacros, donde bordea dorsalmente las capas del asta dorsal que cruzan la línea media. Sus neuronas son generalmente más pequeñas y se hallan ordenadas en forma más densa que aquellas de la Lámina VII adyacente.

1.1.3.2 Centros neurales responsables del movimiento

Las células nerviosas que transmiten información hacia el SNC son las neuronas aferentes. Por su parte, las células nerviosas que transmiten información desde el SNC son las neuronas eferentes. Las células nerviosas que sólo participan en los aspectos locales de un circuito se llaman interneuronas. Estos tres componentes conforman todos los circuitos nerviosos. Todos los circuitos se combinan, a su vez, en sistemas que desempeñan funciones más amplias (Purves *et al.*, 2004).

Existen conjuntos neuronales responsables del control del movimiento, que funcionan como subsistemas, altamente interactivos. El primero de estos subsistemas se corresponde con el circuito presente en el interior de la sustancia gris de la médula espinal. Las células relevantes en este primer subsistema son

las neuronas motoras primarias (α) que envían sus axones fuera de la médula espinal, para inervar las fibras del músculo esquelético, y las interneuronas medulares, que constituyen una fuente relevante de las aferencias sinápticas a las neuronas motoras. Todas las órdenes para el movimiento, reflejo o voluntario, son transmitidas finalmente a los músculos por la actividad de las neuronas motoras α , por lo cual éstas son la vía final común para la conducta motora. Las interneuronas de la médula espinal reciben aferencias sensitivas y proyecciones descendentes desde los centros superiores y brindan gran parte de la coordinación refleja entre los grupos musculares, que es esencial para el movimiento.

El segundo subsistema motor consiste en neuronas cuyos cuerpos celulares se ubican en el tronco encefálico y la corteza cerebral. Los axones de estas neuronas motoras de orden superior o superiores descienden para hacer sinapsis con interneuronas, neuronas motoras α o ambas en la sustancia gris de la médula espinal. Las vías descendentes son esenciales para el control de los movimientos voluntarios y las acciones. Las proyecciones descendentes desde las áreas corticales en el lóbulo frontal, que incluyen la corteza motora primaria, la corteza premotora y la corteza motora suplementaria, son esenciales para iniciar y dirigir los movimientos voluntarios.

El tercero y cuarto subsistemas son estructuras que no tienen acceso directo a las neuronas motoras α o a las interneuronas medulares; en cambio, ejercen control sobre el movimiento mediante la regulación de la actividad de las neuronas motoras superiores que dan origen a las vías descendentes. Uno de estos subsistemas es el cerebelo que, localizado sobre la superficie dorsal de la protuberancia, coordina los componentes de los movimientos complejos. El otro subsistema son los ganglios basales, introducidos en la profundidad del encéfalo anterior. Si bien es difícil caracterizar la contribución de éstos al control motor, los trastornos en la enfermedad de Parkinson y de Huntington,

atestiguan su importancia en la iniciación de los movimientos voluntarios (Purves *et al.*, 2004).

1.1.3.3 Tractos de la médula espinal

La sensibilidad implica la capacidad para transducir, codificar y finalmente percibir información generada por los estímulos que se originan en el medio ambiente externo e interno. Aunque los sentidos básicos: la sensibilidad somática, la visión, la audición, la sensación vestibular y los sentidos químicos, son muy diferentes entre sí, algunas reglas fundamentales gobiernan la forma en que el sistema nervioso se ocupa de cada una de estas diversas modalidades (Purves *et al.*, 2008). A menudo, los trastornos específicos de las diferentes modalidades sensitivas y del movimiento responden al daño de una región en particular del sistema nervioso. Por lo tanto, es esencial conocer los distintos niveles de procesamiento y control para comprender, diagnosticar y tratar esos trastornos.

El conocimiento de la estructura anatómica y de la fisiología de los tractos espinales es fundamental para comprender tanto el comportamiento normal como la etiología de distintos trastornos neurológicos.

Las fibras ascendentes y descendentes de la médula espinal están organizadas en haces más o menos definidos que ocupan áreas específicas de la sustancia blanca. Los haces que tienen el mismo origen, trayecto y terminación se conocen como tractos o fascículos. Se acostumbra a dividir a la sustancia blanca de la médula en tres cordones: dorsal, lateral y ventral. Una columna puede contener diversos fascículos, pero debido a la superposición y entremezclamiento de fibras, no se hallan netamente delimitados. En general, los haces largos tienden a situarse en la periferia, mientras que los cortos son proclives a hacerlo en la parte interna (Carpenter & Sutin, 1990b). Los haces ascendentes en la médula espinal conducen información desde los receptores

sensoriales y las interneuronas hacia el cerebro, mientras que los descendentes transmiten comandos motores y señales que modulan la transmisión de información sensorial a la médula espinal desde los niveles supraespinales (Tracey D, 2004). A continuación, se describen los diferentes tractos de la médula espinal, según Carpenter & Sutin, 1990b y Tracey D, 2004.

1.1.3.3.1 Tractos espinales ascendentes largos

Si bien las fibras aferentes que ingresan a la médula por las raíces dorsales conducen impulsos de todos los tipos, se agrupan de manera tal que las que corresponden a la sensibilidad dolorosa y térmica, a la sensibilidad táctil o a la sensibilidad del movimiento y la posición articular (cinestesia), ascienden juntas en haces más o menos específicos, aunque procedan de diversos segmentos corporales.

Tractos ascendentes dorsales

Gran parte de las fibras más densamente mielinizadas de la raíz dorsal ingresan al cordón dorsal por dentro del asta gris dorsal, donde se bifurcan en ramas ascendentes largas y ramas descendentes cortas. El número de fibras ascendentes derivadas de una raíz dorsal, mantienen una relación con el tamaño de la raíz.

Un surco intermedio dorsal en las regiones cervical y torácica craneal de la médula divide el cordón dorsal en fascículo grácil, interno y fascículo cuneiforme, externo. El tabique intermedio dorsal, que separa a un fascículo de otro, comienza a distinguirse a partir de T6. De este modo, el fascículo grácil existe en cualquier nivel medular que se considere y contiene las ramas largas ascendentes de fibras que provienen de las raíces dorsales sacras, lumbares y las seis torácicas caudales. El otro fascículo, el cuneiforme, que se encuentra por fuera del tabique, contiene ramas ascendentes largas de las seis raíces dorsales torácicas craneales (T1-T6) y de todas las cervicales. Las columnas dorsales

están compuestas por axones mielinizados y transmiten información sensorial proveniente de mecanorreceptores presentes en la piel, músculos y articulaciones.

Las prolongaciones centrales de las células ganglionares de las raíces dorsales constituyen la primera neurona (neurona I) de esta vía ascendente (**Fig. 1.13**). Las fibras ascendentes que llegan al bulbo raquídeo o médula oblonga, siguiendo el fascículo grácil, terminan en las células del núcleo grácil (*nucleus gracilis*), en tanto que las fibras del fascículo cuneiforme terminan alrededor de las células del núcleo cuneiforme (*nucleus cuneatus*). Las neuronas de los núcleos grácil y del cuneiforme constituyen la segunda neurona (neurona II) en este sistema aferente. Los axones de la neurona II se deslizan ventromedialmente, cruzan la línea media y se desvían hacia arriba, como un haz cruzado (*lemnisco medial*), que asciende por el bulbo raquídeo, la protuberancia y niveles protuberanciales, para terminar en el núcleo talámico ventral posterolateral. Las neuronas de relevo de este núcleo talámico (neurona III) envían sus axones a través del brazo posterior de la cápsula interna para terminar en las áreas correspondientes de la corteza cerebral ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Estas fibras constituyen parte de una gran vía sensitiva, extremadamente específica, en la que elementos aislados responden a estímulos táctiles o a estímulos cinestésicos (posición y movimiento), pero no a ambos. Las fibras de este sistema son altamente específicas con respecto a la posición, y tienen capacidad para la discriminación temporal y espacial. También transmiten impulsos provenientes de receptores con asiento en las superficies articulares y en las cápsulas articulares, que son excitados por el movimiento.

Las ramas descendentes de las fibras radicales dorsales tienen longitud variable y sufren desplazamiento hacia dentro y atrás a medida que pasan a segmentos caudales de la médula. En la médula cervical y la mayor parte de la torácica, forman un pequeño manojito en clavija, el *fascículo interfascicular*, que yace

en la mitad de la columna dorsal. En la región lumbar, descienden próximas a la mitad del tabique dorsal en el *fascículo septomarginal*, mientras que en la médula sacra ocupan un pequeño triángulo cerca de la periferia postero-interna (Tracey D, 2004).

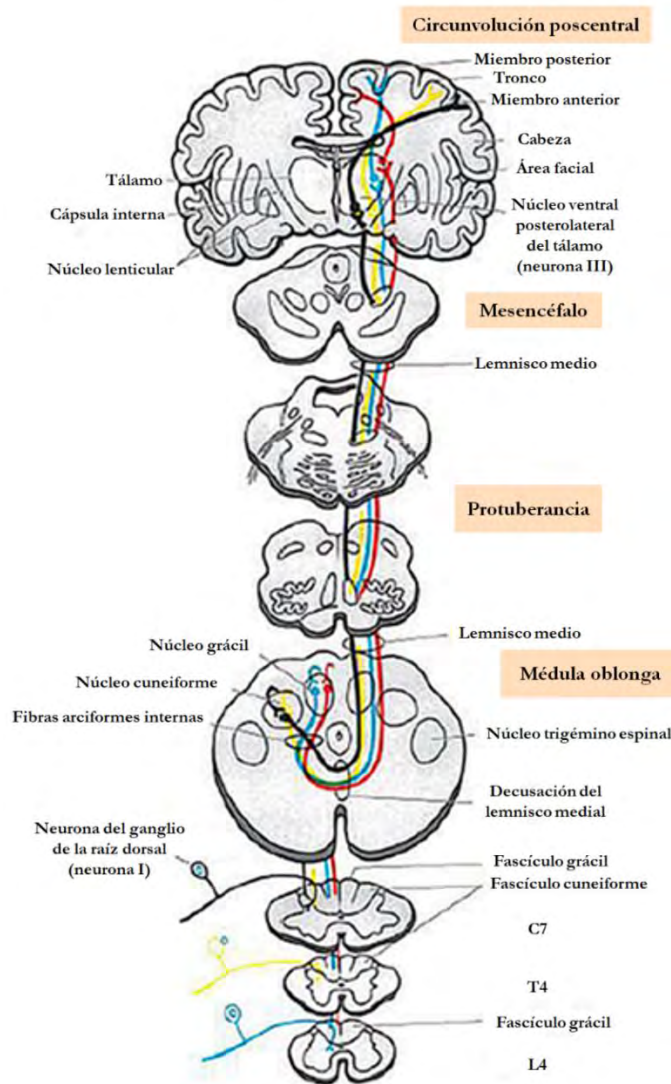


Figura 1.13. Tractos ascendentes dorsales. El funículo está formado por ramas ascendentes y descendentes de las células de los ganglios espinales. Las fibras ascendentes de los fascículos grácil y cuneiforme establecen sinapsis en los núcleos grácil y cuneiforme. Las fibras que forman el lemnisco medial se originan en células de los núcleos grácil y cuneiforme, se cruzan en la porción inferior del bulbo raquídeo y ascienden al tálamo. Las fibras ascendentes que ingresan a la médula espinal a diferentes niveles se muestran discriminadas en colores: rojo (sacro), azul (lumbar), amarillo (torácico) y negro (cervical). Modificado de Carpenter & Sutin, 1990b.

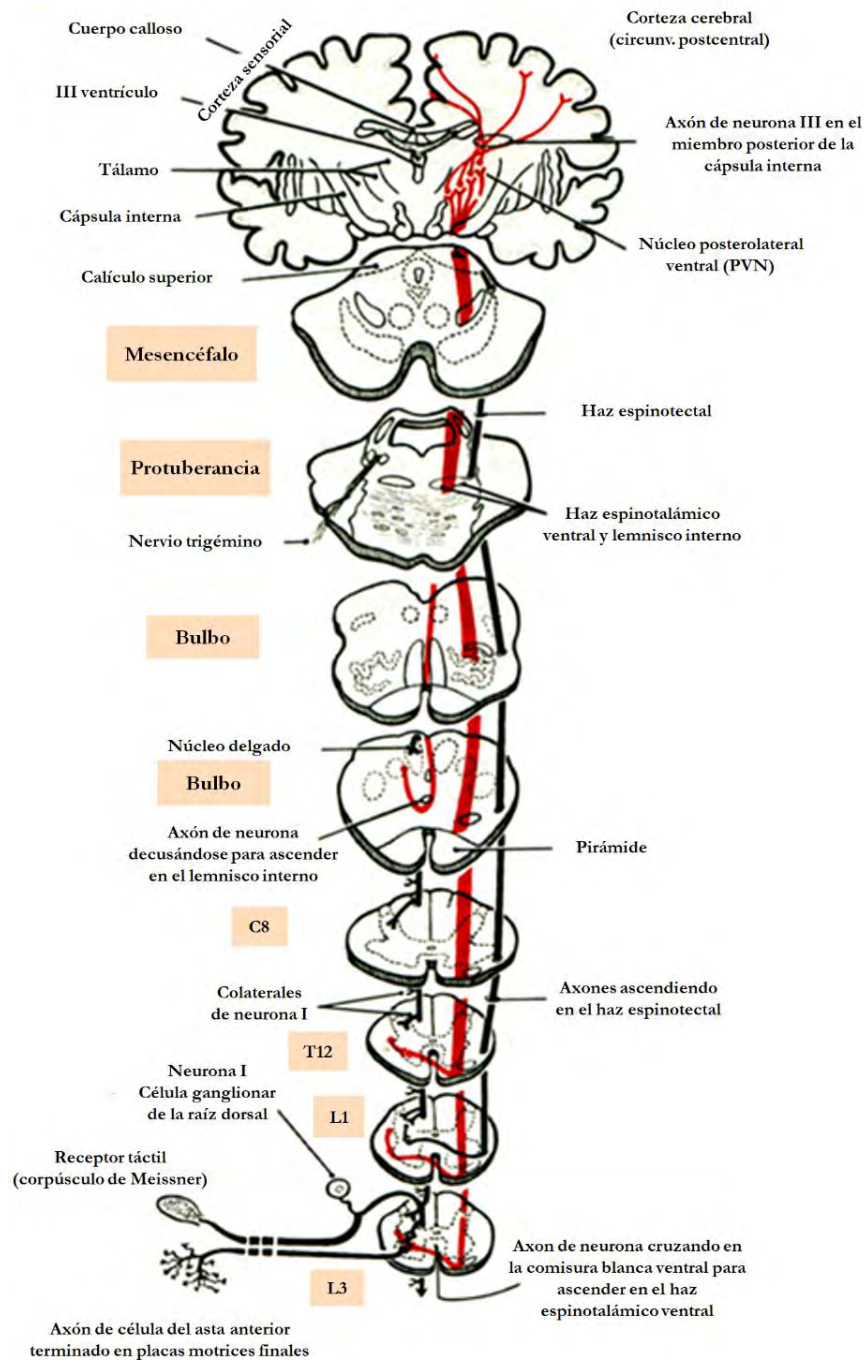


Figura 1.14. Tractos espinotalámico ventral (rojo) y espinotectal (negro). Estos tractos se originan en células de múltiples Láminas de la médula espinal, en todos los niveles. Las fibras del tracto espinotalámico se originan en células de las Láminas I, IV y V contralaterales. El tracto espinotectal asciende en asociación con el tracto espinotalámico ventral, pero termina en las capas profundas del tubérculo cuadrigémino superior contralateral. Modificado de [Carpenter & Sutin, 1990b](#).

Tracto espinotalámico ventral

La mayor parte de las células que conforman este haz se localizan contralateralmente en las Láminas IV y V. Está bien establecido que las fibras espinotalámicas cruzan en la comisura blanca anterior y que la decusación tiene lugar a través de varios segmentos medulares. Las fibras que ascienden contralateralmente en las columnas ventral y ventrolateral forman el haz espinotalámico ventral. Las fibras de este haz ascienden sin interrupción alguna hasta niveles talámicos (**Fig. 1.14**).

El fascículo espinotalámico ventral transmite, a niveles más elevados, impulsos vinculados con lo que se denomina “tacto superficial”. Esta sensibilidad complementa al tacto profundo y a la sensibilidad táctil discriminativa conducida en los cordones blancos dorsales ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Tracto espinotalámico lateral

Se halla íntimamente relacionado con el haz espinotalámico ventral. Las fibras que lo componen se concentran más que aquel y entre ellas hay una cantidad mayor de fibras largas que se dirigen directamente al tálamo (**Fig. 1.15**). Se origina en células de las Láminas I, IV y V, y los axones, que se cruzan en la comisura blanca ventral, ascienden a la columna lateral del lado opuesto como haz espinotalámico lateral. Fibras de este haz se cruzan oblicuamente hacia el lado opuesto dentro del segmento de ingreso, si bien algunas pueden ascender un segmento antes de cruzarse. Las fibras que se relacionan con la sensibilidad térmica están situadas dorsalmente, mientras que las vinculadas al dolor ocupan una posición ventral ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

En la rata, al menos el 50 % de las neuronas de este tracto están ubicadas en los primeros cuatro segmentos cervicales, y aproximadamente el 90 % de las neuronas tienen terminaciones axonales contralaterales a sus cuerpos celulares. En la médula espinal sacra de la rata, una proporción significativa de las

neuronas de este tracto responden a las entradas viscerales nocivas, como la distensión del colon, el recto y la vagina ([Tracey D, 2004](#)).

Tracto espinocervical

Las células de las que nace este haz asientan en la Lámina IV en todos los niveles medulares y en menor medida en las Láminas I, III y V. Estos axones dan origen a fibras no cruzadas que ascienden en las columnas dorsolaterales. Estas células del asta gris dorsal son activadas a través de una sola sinapsis por aferentes radiculares dorsales, que responden principalmente a estímulos cutáneos de bajo umbral. Los axones de las células de este haz ascienden homolateralmente en las columnas dorsolaterales y establecen sinapsis con células del núcleo cervical lateral. Este núcleo da origen a fibras que se cruzan en la comisura blanca anterior a nivel de los segmentos medulares primero y segundo, y ascienden junto con el lemnisco medial al tálamo ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Tracto cervicotalámico

La columna dorsal y el lemnisco medial, y la proyección espinocervicotalámica pueden estar ligados desde el punto de vista funcional, puesto que algunas colaterales espinocervicales terminan en los núcleos columnares dorsales y algunas células de estos últimos núcleos se proyectan hacia el núcleo cervical lateral. Puede conducir impulsos relacionados con estímulos dolorosos y también desempeña un papel en la integración de funciones motoras ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Tracto espinotectal

Las fibras de este haz pequeño cruzado, localizado en la parte ventrolateral de la médula espinal, ascienden por la médula y el tronco del encéfalo asociado con el sistema espinotalámico. Ciertas fibras espinotectales también terminan en regiones laterales de la sustancia gris central. Se cree que esta vía se relaciona

con actividades reflejas mesencefálicas (reflejos espinovisuales y los movimientos de ojos y cabeza hacia la fuente de estimulación); también se postula que forma parte de una vía multisináptica que transmite impulsos nociceptivos (Carpenter & Sutin, 1990b).

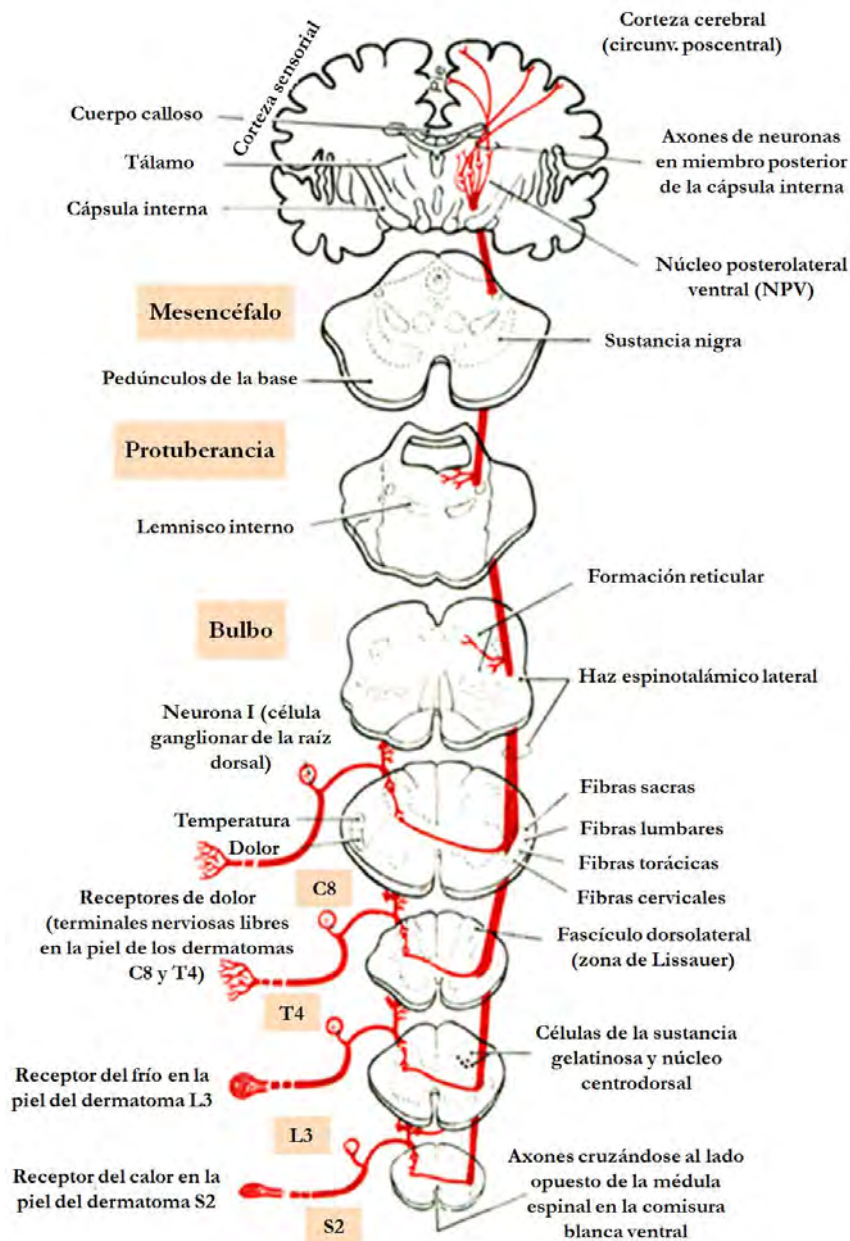


Figura 1.15. Tracto espinotalámico lateral (rojo). Las fibras de este tracto decusan a través de la comisura blanca ventral. Proyecta sus fibras, preferencialmente, al núcleo ventral posterolateral del tálamo, con proyecciones limitadas al núcleo centrolateral y mediodorsal del tálamo. Modificado de Carpenter & Sutin, 1990b.

Tracto espinocerebeloso dorsal

Este haz ascendente directo tiene su origen en grandes células del núcleo dorsal que se extiende desde el primer segmento torácico (T1) al tercer segmento lumbar (L3) (**Fig. 1.16**). Las fibras aferentes alcanzan los núcleos siguiendo las raíces dorsales. Las células del núcleo dorsal dan origen a grandes fibras que pasan lateralmente a la sustancia blanca homolateral y ascienden a lo largo de la médula espinal. En el bulbo raquídeo, las fibras de este haz pasan a incorporarse al pedúnculo cerebeloso inferior, ingresan al cerebelo y terminan en porciones rostrocaudales del vermis. La vía directa, que va de la periferia al cerebelo, consta de dos neuronas: las células del ganglio espinal y las células del núcleo dorsal. Muchas fibras del haz espinocerebeloso ventral se desplazan hacia atrás a medida que ascienden y se van incorporando al haz espinocerebeloso dorsal. Los impulsos retransmitidos al cerebelo a través del haz espinocerebeloso dorsal nacen en los husos musculares y los órganos tendinosos de Golgi y en los receptores del tacto y la presión. De este modo, el haz espinocerebeloso dorsal sirve como estación de relevo de los impulsos provenientes de los receptores de estiramiento, receptores del tacto y receptores de presión, directamente desde niveles medulares a determinadas partes del cerebelo. Los impulsos conducidos por este haz se utilizan en la coordinación fina de la postura y el movimiento muscular individual de los miembros ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Tracto espinocerebeloso ventral

Se encuentra situado a lo largo de la periferia lateral de la médula espinal, hacia ventral del haz espinocerebeloso dorsal y hacia dorsal del sitio de emergencia de las fibras de la raíz ventral. Los axones entran al funículo lateral a partir del cual ascienden hacia el cerebelo. Los axones se superponen con los del tracto espinocerebeloso ventral en el funículo lateral y entran al cerebelo a través del

pedúnculo cerebeloso inferior. Las neuronas que dan lugar al tracto espinocerebeloso ventral incluyen grupos de células grandes en las Láminas VII y IX de la médula espinal lumbar. En los segmentos medulares cervicales superiores, cierto número de fibras del haz se incorporan al haz espinocerebeloso dorsal ([Tracey D, 2004](#)).

Dos tipos de neuronas componen esta vía que alcanza el cerebelo: las neuronas de tipo I, en los ganglios radicales dorsales, y las neuronas de tipo II, en los grupos celulares dispersos de la base de las astas ventral y dorsal de segmentos medulares lumbosacroccígeos. Las fibras de la neurona II se entrecruzan en la médula espinal y ascienden a través de esta última, el bulbo raquídeo y la protuberancia. Las fibras de este haz son activadas por impulsos aferentes que llegan desde los órganos tendinosos de Golgi. Se presume que las fibras de este sistema conducen información concerniente al movimiento o postura de todo el miembro, más que información de movimientos de músculos individuales ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Tracto cuneocerebeloso y tracto espinocerebeloso rostral

Además de los haces espinocerebelosos dorsal y ventral, vinculados principalmente a los miembros posteriores y partes caudales del cuerpo, existen dos haces equivalentes, el cuneocerebeloso y el espinocerebeloso rostral, que retransmiten información sensitiva de partes de miembros anteriores y rostrales del cuerpo. Los haces espinocerebeloso dorsal y el cuneocerebeloso son similares y conducen información proveniente de husos musculares, órganos tendinosos y receptores cutáneos para tacto y presión. Debido a que hacia cranial del segmento C8 no existe núcleo dorsal, las grandes fibras de los nervios cervicales que ingresan en los segmentos craneales a este nivel, ascienden homolateralmente en el fascículo cuneiforme. Los axones de estas células se

proyectan a la porción laterodorsal y rostral del núcleo cuneiforme accesorio para proyectarse luego al cerebelo, a través del pedúnculo cerebeloso inferior. Los haces espinocerebeloso ventral y rostral ofrecen la similitud de conducir impulsos aferentes de órganos tendinosos y de reflejos flexores, ambos con amplios campos receptivos. Las células que le dan origen están localizadas en las Láminas V-VII de los segmentos cervicales C5-C8. Las fibras ascienden por la porción ventral del funículo lateral, para ingresar al cerebelo por los pedúnculos cerebelosos inferior y superior (Carpenter & Sutin, 1990b).

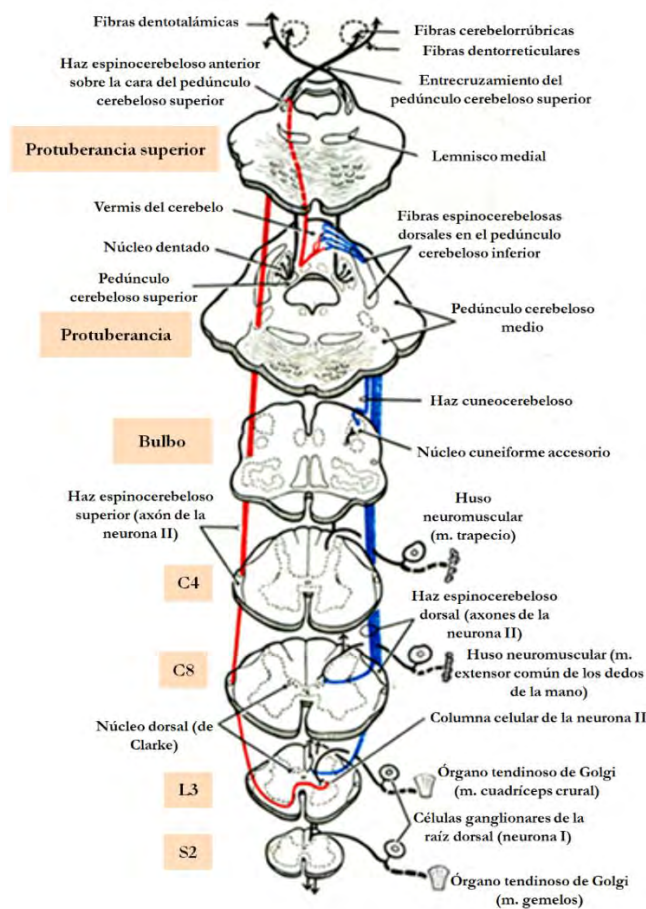


Figura 1.16. Tractos espinocerebeloso dorsal (azul), ventral (rojo) y el tracto cuneocerebeloso (azul). El tracto espinocerebeloso dorsal se origina en células del núcleo dorsal (de Clarke) y no decusa. Las fibras del tracto espinocerebeloso ventral, por otro lado, nacen en células situadas en las Láminas V, VI y VII y decusan hacia el lado contralateral. Las fibras del tracto cuneocerebeloso, que se originan en células del núcleo cuneiforme accesorio de la médula oblonga y no decusan, se consideran como rama superior equivalente del tracto espinocerebeloso dorsal. Modificado de Carpenter & Sutin, 1990b.

Vías espinoolivares

Las fibras del haz espinoolivar dorsal ascienden en las columnas blancas dorsales hasta los núcleos delgado y cuneiforme; los núcleos de la columna dorsal retransmiten impulsos a partes de los núcleos olivares accesorios. Los haces múltiples espinoolivares ventrales ascienden contralateralmente en las columnas ventrales y terminan en porciones de los núcleos olivares accesorios dorsal e interno.

Las fibras que contribuyen a la formación de este tracto resultan activadas por aferentes cutáneos, provenientes de los órganos tendinosos de Golgi (Carpenter & Sutin, 1990b).

Fibras espinorreticulares

Las fibras espinorreticulares se originan en neuronas localizadas, en su mayoría, en las Láminas VII y VIII de los segmentos cervicales y lumbares. Son fibras que ascienden por el funículo ventrolateral homolateralmente, terminan en la formación reticular del troco encefálico, en el núcleo reticular rostral y caudal de la protuberancia (**Fig. 1.17**). En lo funcional, las fibras espinorreticulares desempeñan un importante papel en el procesamiento de la información dolorosa y las respuestas emocionales asociadas (Carpenter & Sutin, 1990b).

1.1.3.3.2 Tractos espinales descendentes largos

El más importante y de mayor tamaño de estos tractos tiene su origen en la corteza cerebral; todos los otros haces espinales descendentes se originan en grupos celulares que se localizan en los tres segmentos más bajos del tronco del encéfalo. Tres de ellos provienen del mesencéfalo (tractos tectoespinal, intersticioespinal y rubroespinal), mientras que los dos tractos espinales descendentes principales se originan en la protuberancia y son el vestibuloespinal y el pontino reticuloespinal (Carpenter & Sutin, 1990b).

Tracto corticoespinal

Todas las fibras de este tracto se originan en neuronas situadas en la corteza cerebral, pasan a través de la pirámide bulbar e ingresan en la médula espinal. Es muy grande la variación de tamaño de las neuronas de origen del sistema corticoespinal, las que se disponen en tiras o ramilletes, en diferentes áreas corticales. En la unión bulbomedular, las fibras sufren un entrecruzamiento incompleto y originan tres haces: un haz corticoespinal lateral (cruzado), un haz corticoespinal ventral (no cruzado) y un pequeño haz corticoespinal ventrolateral (no cruzado) (**Fig. 1.18**).

La mayoría de las fibras se entrecruzan en la decusación piramidal y descienden en la parte dorsal de la columna lateral, como haz corticoespinal lateral o cruzado, situándose entre el haz espinocerebeloso dorsal, y el fascículo lateral propio. El haz llega a la porción más caudal de la médula y disminuye progresivamente de tamaño, a medida que las fibras van terminando en la sustancia gris ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

La mayoría de los axones del haz corticoespinal ventral se cruzan en segmentos medulares cervicales en la comisura blanca anterior y terminan en la sustancia gris intermedia y la parte centromedial del asta ventral. Las fibras del haz corticoespinal ventral no cruzado siguen sin decusarse y terminan en la base del asta dorsal, la sustancia gris intermedia y partes centrales del asta ventral.

Si se destruye el haz piramidal sobreviene la pérdida de los movimientos voluntarios de las regiones distales de las extremidades.

Existen por lo menos dos componentes en el haz piramidal, uno grande, de fibras delgadas, proveniente del área motora, y uno de fibras delgadas, que proviene de todas las otras áreas que aportan fibras al haz. Las fibras que se originan en las células piramidales tienen participación en los movimientos aislados más finos de las partes distales de las extremidades. Las fibras más finas

y numerosas pueden vincularse con el movimiento más grosero y la regulación del tono. Estas fibras, que forman una parte integral del haz piramidal, descienden ininterrumpidamente desde la corteza cerebral hasta la médula espinal a través de las pirámides bulbares (Carpenter & Sutin, 1990b).

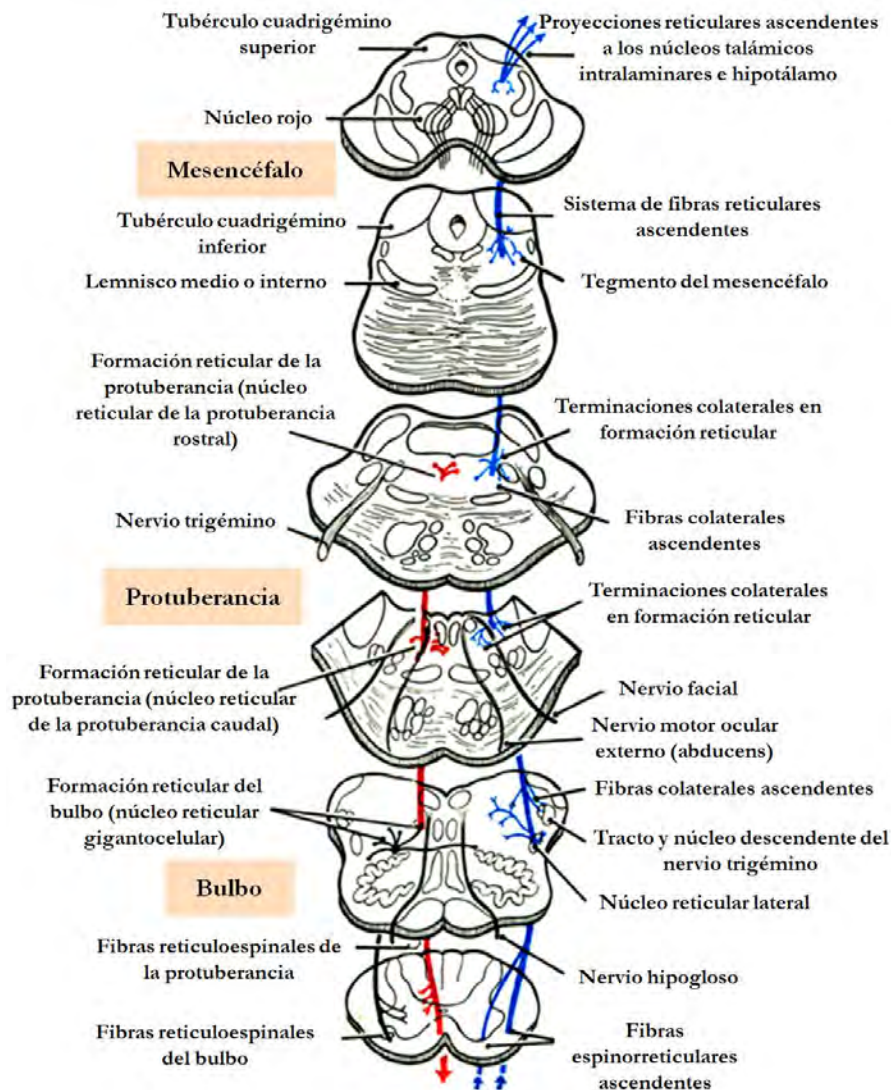


Figura 1.17. Fibras reticulares ascendentes y descendentes. El tracto espinorreticular ascendente y colateral (azul) emite fibras en varios niveles del tronco del encéfalo y la vía se incrementa con fibras de proyección rostral. Las fibras reticuloespinales protuberanciales (rojo) no se cruzan. Se originan principalmente en el núcleo reticular gigantocelular y se proyectan de manera bilateral a los niveles espinales de la parte anterior de los cordones laterales. Modificado de Carpenter & Sutin, 1990b.

Las células piramidales y sus axones constituyen las “neuronas motoras altas o superiores” en contraste con las “neuronas motoras bajas o inferiores” (células del asta ventral) que inervan directamente los músculos estriados.

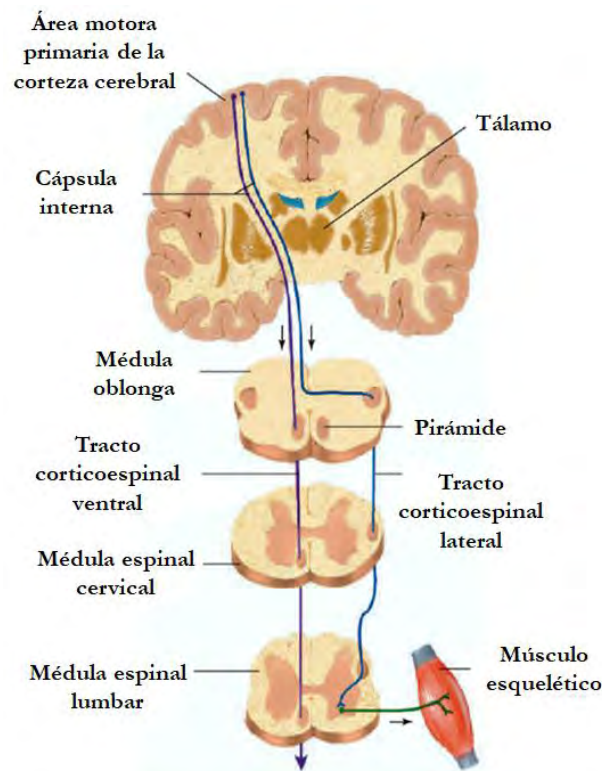


Figura 1.18. Tracto corticoespinal. Las fibras de este tracto se originan en la corteza cerebral. En la unión bulbomedular se originan los diferentes haces. El haz corticoespinal lateral termina en la sustancia gris intermedia y la parte centromedial del asta ventral. Las fibras del haz corticoespinal ventral no cruzado siguen sin decusarse y terminan en la base del asta dorsal, la sustancia gris intermedia y partes centrales del asta ventral. Modificado de [Silva et al., 2014](#).

Tracto tectoespinal

Las fibras de este haz se originan en neuronas de las capas profundas del tubérculo cuadrigémino superior (**Fig. 1.19**). El haz está formado por fibras que se deslizan hacia delante y al medio alrededor de la sustancia gris que rodea el acueducto y cruzan la línea media hacia craneal de la columna longitudinal media en la decusación tegmentaria dorsal. En el tronco del encéfalo superior,

este haz desciende cerca del rafe anterior mediano hasta la columna longitudinal media; en planos bulbares, las fibras tectoespinales se incorporan a la columna longitudinal media. En la médula espinal, descienden por la porción ventral de la columna anterior, cerca del surco medio anterior. En su mayoría, las fibras terminan en los cuatro segmentos cervicales superiores de la médula, pero hay algunas que alcanzan segmentos cervicales inferiores. Las fibras tectoespinales ingresan en el asta ventral y se irradian en las Láminas V, VI, VII y VIII. Ninguna de estas fibras termina directamente en neuronas motoras grandes (Carpenter & Sutin, 1990b).

Tracto rubroespinal

Las fibras de este tracto nacen en células del núcleo rojo, un gran conglomerado celular oval. Las fibras rubroespinales emergen del borde medial del núcleo rojo, cruzan el rafe mediano inmediatamente en la decusación tegmentaria ventral y descienden hasta niveles medulares, donde asientan en un plano anterior a las fibras del haz corticoespinal lateral, con las que se entremezclan parcialmente (**Fig. 1.19**). Las fibras de este tracto ingresan a la sustancia gris de la médula lateralmente y se irradian en abanico dentro de la mitad lateral de la Lámina V, VII y partes dorsocentrales de la Lámina VII. A medida que descienden a través del tronco del encéfalo, hay desprendimiento de fibras colaterales del haz rubroespinal que se proyectan al cerebelo, al núcleo facial y al núcleo reticular lateral del bulbo (Carpenter & Sutin, 1990b).

El núcleo rojo recibe fibras del cerebelo y de la corteza cerebral. Se cree que es una vía indirecta de relevancia, por la cual el cerebelo y la corteza cerebral pueden influir sobre las motoneuronas inferiores α y γ , facilitando la actividad de los músculos flexores e inhibiendo la actividad de los extensores (Carpenter & Sutin, 1990b).

Tracto intersticioespinal

Este haz no es cruzado y forma un componente de la columna longitudinal medial descendente (ver más adelante).

Tracto vestibuloespinal

Este tracto se origina en el núcleo vestibular lateral. Prácticamente todas las células de este núcleo aportan fibras para la formación de este tracto, las cuales descienden por toda la médula espinal en la parte ventral de la columna lateral (**Fig. 1.20**). Las fibras de este tracto descienden a lo largo de la médula espinal.

Los segmentos cervicales y lumbares de la médula reciben el mayor número de fibras vestibuloespinales. En los segmentos medulares cervicales, las fibras se localizan en la parte ventral de la columna lateral, pero en los segmentos lumbosacros la mayoría de las fibras se encuentran en la columna ventral.

Las fibras vestibuloespinales ingresan en la sustancia gris y se distribuyen por doquier en la Lámina VIII y las partes medial y central de la Lámina VII.

Este tracto retransmite impulsos a la médula espinal provenientes de porciones laberínticas y porciones específicas del cerebelo. El núcleo vestibular lateral ejerce influencias facilitadoras sobre la actividad refleja de la médula espinal y los mecanismos medulares a cuyo cargo está el tono muscular ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Haces reticuloespinales

Dos regiones de la formación reticular del tronco del encéfalo, relativamente grandes, dan origen a fibras que descienden a la médula. Una de ellas se encuentra en el techo protuberancial y la otra en el bulbo, lo que justifica denominar los haces como pontorreticuloespinal y bulborreticuloespinal (**Fig. 1.21**).

El haz reticuloespinal protuberancial se origina en conglomerados celulares en la parte medial de la calota protuberancial. Por su parte, el haz pontorreticuloespinal tiene asiento casi enteramente homolateral y desciende principalmente en la parte medial de la columna anterior. En el tronco del encéfalo parte de estas fibras descienden en íntima asociación con la columna longitudinal medial. Las fibras pontinorreticuloespinales son más numerosas que las que se originan en el bulbo, descienden por toda la médula espinal y terminan en la Lámina VIII y partes adyacentes de la VII (Carpenter & Sutin, 1990b).

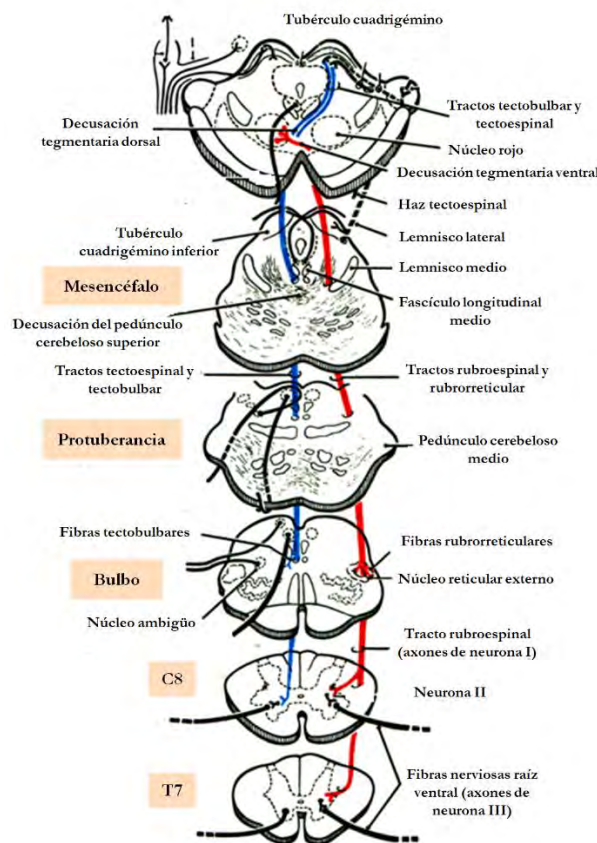


Figura 1.19. Tractos rubroespinal (rojo) y tectoespinal (azul). Las fibras rubroespinales se originan en el núcleo rojo, se cruzan en la decusación tegmentaria ventral y descienden a niveles espinales, terminando en partes de las Láminas V y VI. Las fibras rubroespinales se proyectan a partes del núcleo facial y al núcleo reticular lateral de la médula oblonga. Las fibras tectoespinales se originan en las capas profundas del tubérculo cuadrigémino superior, se cruzan en la decusación tegmentaria dorsal y descienden por el fascículo ventral. Las fibras del tracto tectoespinal sólo descienden hasta los primeros segmentos cervicales de la médula espinal. Modificado de Carpenter & Sutin, 1990b.

El haz reticuloespinal bulbar se origina en los dos tercios mediales de la formación reticular bulbar. Las fibras del haz bulborreticuloespinal son principalmente homolaterales, aun cuando existan algunas cruzadas, las cuales efectúan su decusación en niveles bulbares. Este haz desciende por toda la médula espinal en la parte anterior de la columna lateral. Las fibras que penetran en la sustancia gris medular se irradian en todas las regiones de la Lámina VII y terminan, sobre todo, en la región central de esta Lámina. Hay otras fibras que, en menores cantidades, se distribuyen en las Láminas VIII y IX. Estos tractos son importantes vías que llevan impulsos, desde el mesencéfalo y rombencéfalo, relacionadas con el control del tono muscular (Carpenter & Sutin, 1990b).

Tractos rafespinal y ceruleospinal

Neuronas del núcleo del rafe magno y de la formación reticular gigantocelular se proyectan a la médula espinal a lo largo del funículo dorsolateral y terminan haciendo sinapsis con células del asta dorsal (tracto rafespinal). Los axones de neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe magno hacen sinapsis con células de las Láminas I, II, V y neuronas preganglionares de la Lámina VII. Por otro lado, las neuronas noradrenérgicas del *locus ceruleus* envían algunos de sus axones a través de la columna ventral de la médula espinal hasta las Láminas I, II, V, VII y IX, formando el tracto ceruleospinal. Se cree que estos tractos influyen en la modulación de la actividad motora, la función reproductiva y excretora, y la percepción del dolor (Carpenter & Sutin, 1990b).

Columna longitudinal medial

Las fibras descendentes de la columna longitudinal medial de la médula espinal se originan en el núcleo vestibular medial, la formación reticular, el tubérculo cuadrigémino superior (fibras tectoespinales) y el núcleo intersticial de Cajal (fibras intersticioespinales). Las fibras de este haz forman uno bien definido,

únicamente en los segmentos cervicales superiores de la médula espinal; por debajo de ese nivel, la mayoría de las fibras son difíciles de seguir (Carpenter & Sutin, 1990b).

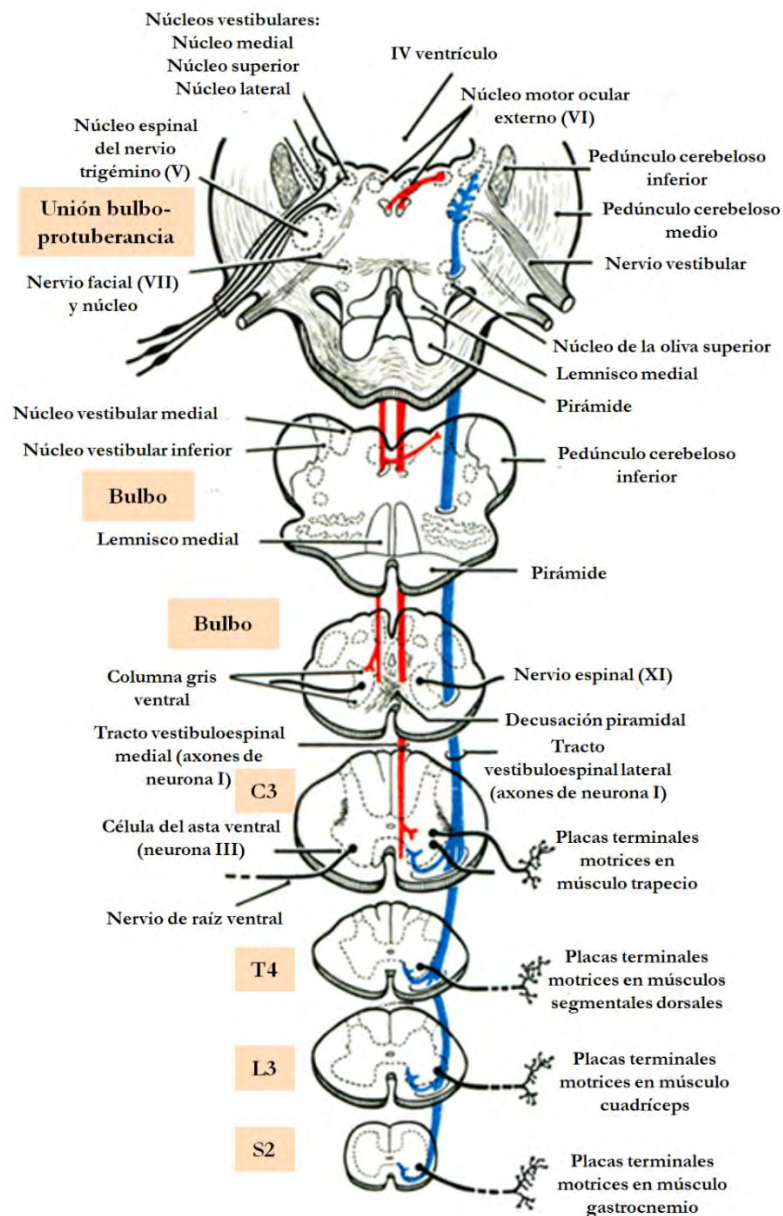


Figura 1.20. Tractos vestibuloespinal lateral (azul) y vestibuloespinal medial (rojo). Las fibras del tracto vestibuloespinal lateral tienen origen en el núcleo vestibular lateral, desciende por toda la médula alcanzando los niveles lumbrosacros. Las fibras del tracto vestibuloespinal medial nacen en el núcleo vestibular medial y descienden bilateralmente por el fascículo surcomarginal para hacer sinapsis con células del asta ventral en la Lámina VII y VIII. Modificado de Carpenter & Sutin, 1990b.

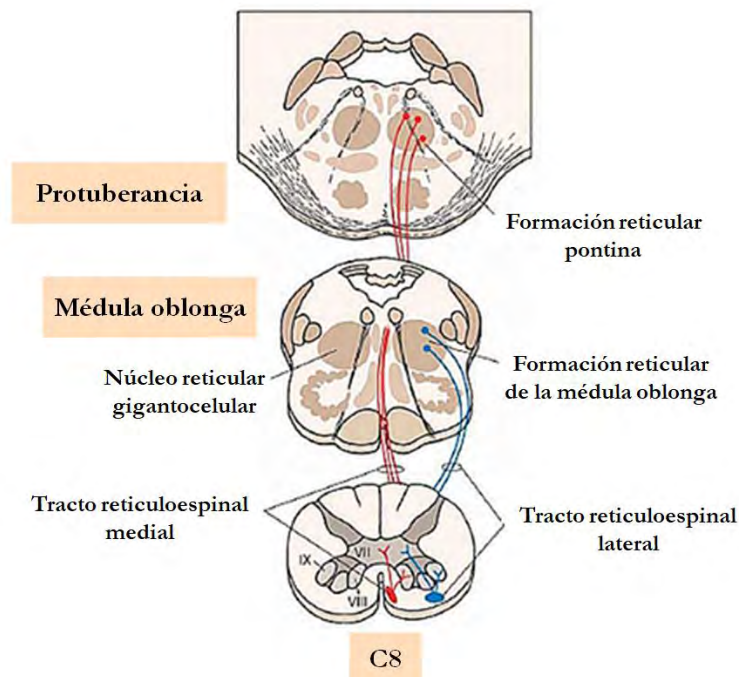


Figura 1.21. Tractos reticulomedial (rojo) y lateral (azul). El tracto surge de la formación reticular (núcleo reticuloespinal pontino y gigantocelular) y desciende bilateralmente a todos los segmentos medulares (sólo se muestra el trayecto ipsilateral). Modificado de [Nishida, 2014c](#).

Las fibras vestibulares que descienden en la columna longitudinal medial se originan sólo en el núcleo vestibular medial, son de predominio homolateral en la médula espinal y terminan en la parte dorsal de la Lámina VIII y en regiones adyacentes de la Lámina VII. El componente más grande de las fibras descendentes en la columna longitudinal medial, a nivel medular, es el haz pontorreticuloespinal; estas fibras descienden a lo largo de la médula espinal y terminan principalmente en la Lámina VIII y partes de la VII ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Tracto olivoespinal

Se considera que este haz se compone de fibras delgadas localizadas en la superficie anterior de la médula espinal en la zona de transición entre las columnas lateral y ventral ([Carpenter & Sutin, 1990b](#)).

Vías autonómicas descendentes

La médula espinal también contiene fibras descendentes que se originan en grupos nucleares vinculados con varias funciones autonómicas o viscerales. Estas fibras autonómicas descendentes terminan en relación con neuronas medulares que inervan estructuras viscerales e influyen su actividad (Carpenter & Sutin, 1990b).

1.1.4 Meninges y sistema ventricular

El SNC está rodeado por tres membranas o meninges: duramadre, aracnoides y piamadre (Fig. 1.22). La más externa, la duramadre, es fuerte y se separa de la pared del canal vertebral por el espacio epidural, que está ocupado por grasa y por el plexo venoso vertebral interno. La grasa y los vasos juntos almohadillan la médula espinal y permiten que se ajuste a los movimientos del cuello y de la espalda (Dyce & Molenaar, 1999). La duramadre se extiende a lo largo de las raíces nerviosas y se continua con el tejido conectivo que rodea los nervios espinales. Su cara interna está en contacto directo con la aracnoides (Greenstein & Greenstein, 2000).

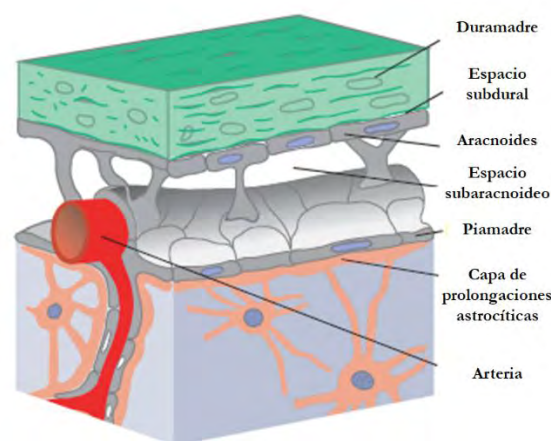


Figura 1.22. Las meninges y el espacio subaracnoideo de la médula espinal. Modificado de Brodal, 2010.

La aracnoides es una capa impermeable y relativamente frágil que cubre la médula espinal, el cerebro y las raíces de los nervios espinales. Está separada de la piamadre por el espacio subaracnoideo, el cual contiene fluido cerebroespinal. Su superficie más interna está unida a la piamadre por numerosas trabéculas y filamentos. La piamadre recubre la médula espinal siguiendo con precisión cada variación de su contorno. Es una membrana altamente vascularizada y muy cercana a la médula espinal. Se engrosa en cada lado de las raíces nerviosas para formar los soportes laterales, anclados a la aracnoides, que suspenden con seguridad a la médula espinal en el centro del canal medular ([Greenstein & Greenstein, 2000](#)).

El espacio subaracnoideo que contiene el líquido cerebroespinal, acuoso y claro, es mucho más ancho que el espacio subdural, pero menos uniforme, especialmente en su parte craneal. Las partes más anchas (cisternas) del espacio subaracnoideo craneal están localizadas entre las porciones más sobresalientes de la superficie ventral del encéfalo y en el ángulo entre el cerebelo y la cara dorsal del bulbo raquídeo. El ensanchamiento dorsal, la cisterna cerebelobulbar o cisterna magna, es especialmente grande y fácilmente accesible desde el exterior, en el animal vivo, se puede tener acceso a ella por medio de una aguja entre el atlas y el cráneo ([Dyce & Molenaar, 1999](#)).

El sistema ventricular consiste en cuatro dilataciones, ventrículos o cavidades, llenas de líquido, de forma irregular dentro del SNC. Los dos ventrículos laterales son los más grandes y se encuentran en los hemisferios cerebrales. Ambos se comunican con el tercer ventrículo. El tercer ventrículo, situado entre el cerebelo y el tallo cerebral, se comunica con el cuarto ventrículo a través del estrecho acueducto cerebral ([Brodal, 2010](#)).

De la cantidad de LCR que se produce diariamente, un 27 % se halla en los ventrículos y el espacio subaracnoideo, y aproximadamente el 15 % rodea la médula espinal. Por lo tanto, el monto total se renueva varias veces al día. Esto

significa que deben existir medios efectivos de drenaje. El fluido producido en los ventrículos laterales fluye hacia el tercer ventrículo a través del foramen interventricular (de Monro). Desde allí, el fluido continúa a través del estrecho acueducto cerebral hasta el cuarto ventrículo. Los plexos coroideos en el tercer y cuarto ventrículos agregan más líquido. El líquido sale del sistema ventricular y entra en el espacio subaracnoideo (más específicamente, la cisterna magna) a través de tres aberturas presentes en el cuarto ventrículo: una en la línea media posterolateral (el foramen de Magendie) y dos lateralmente (recesos laterales o foraminales de Luschka) (Brodal, 2010). En el año 2011, nuestro grupo determinó que, al menos en la rata, existe una comunicación directa entre el cuarto ventrículo y el canal central de la médula espinal (Nishida *et al.*, 2011). Esta comunicación hace propicia la utilización de esta vía para la administración de diferentes soluciones dentro del cuarto ventrículo, de relativamente fácil acceso al SNC, para que tengan su efecto dentro de la médula espinal.

El LCR es un fluido claro e incoloro, formado por la ultrafiltración del plasma sanguíneo a través de la barrera hematoencefálica, compuesta por las células del endotelio vascular. Además de su papel mecánico, el LCR protege al encéfalo por su capacidad como tampón químico, que procura un medio interno muy estable; transporta nutrientes, elimina productos de desecho y sirve como medio de difusión de las sustancias neuroendocrinas y neurotransmisoras (**Fig. 1.23**) (Dyce & Molenaar, 1999).

La concentración de sodio, potasio y varios otros iones es aproximadamente la misma en el LCR que en la sangre. Una diferencia importante concierne a las proteínas: normalmente hay muy poca proteína en el LCR (menos del 0,5 % de la concentración de proteína que se halla en el plasma).

El agua y las sustancias solubles son intercambiables libremente entre el LCR y el líquido intersticial del tejido nervioso, debido a que el epéndimo es libremente permeable al agua e incluso a pequeñas moléculas de proteínas. Otras sustancias

parecen aprovechar al LCR como un medio para alcanzar receptores específicos cerca de los ventrículos (Brodal, 2010).

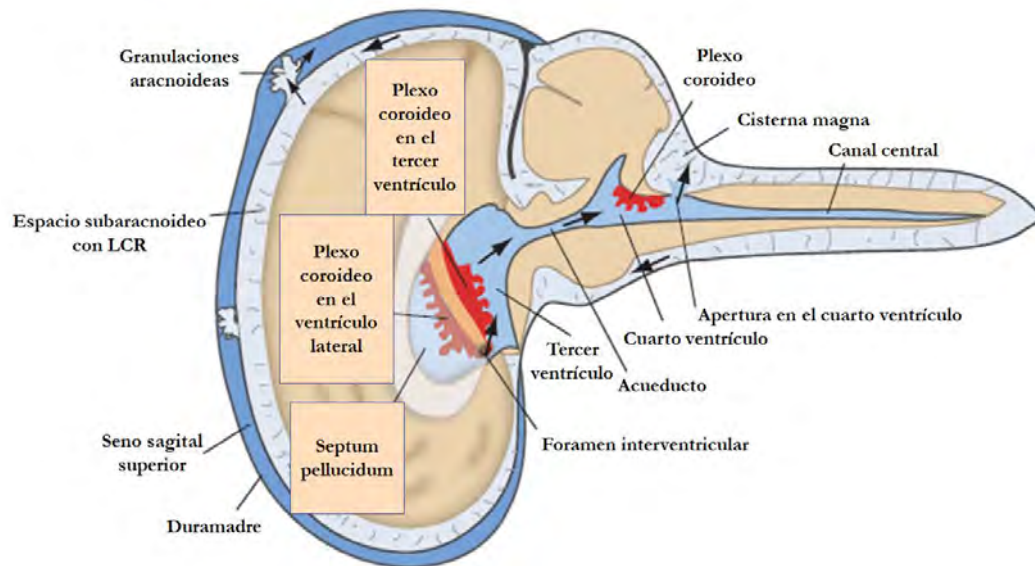


Figura 1.23. El sistema ventricular, el espacio subaracnoideo y el plexo coroideo. Todos los ventrículos contienen plexo coroideo. Las flechas indican el flujo del LCR desde los ventrículos hacia el espacio subaracnoideo a través de las aberturas en las paredes del cuarto ventrículo. Modificado de Brodal, 2010.

1.2 Lesiones del Sistema Nervioso Central

Los componentes del SNC se ven afectados por diferentes enfermedades neurológicas únicas y distintivas, pero también responden de manera distintiva frente a insultos comunes, tales como isquemia o infecciones (Frosch *et al.*, 2015).

1.2.1 Respuesta de las neuronas a la lesión

La lesión neuronal puede ser un proceso agudo, a menudo como consecuencia del agotamiento de oxígeno o de glucosa, o un trauma, o un proceso lento, normalmente asociado con la acumulación de agregados de proteínas

anormales, como puede ocurrir en los desórdenes degenerativos del cerebro (Frosch *et al.*, 2015).

Las neuronas pueden morir a causa de una injuria por uno de dos mecanismos: apoptosis o necrosis. La apoptosis es un mecanismo que conduce a la muerte celular "programada", que tiene lugar en células aisladas y es dirigido genéticamente. Este mecanismo es utilizado durante el desarrollo del sistema nervioso para garantizar la migración y orientación adecuada de las capas celulares y la eliminación del exceso de células embrionarias; para eliminar células "envejecidas" (es decir, renovación celular) en órganos y para mantener la homeostasis del número celular en sistemas de órganos que tienen capacidad regenerativa (glándulas endocrinas).

Algunas infecciones virales, como la infección por el virus de la panleucopenia felina, que ocurren en el útero, producen anomalías en el desarrollo al iniciar la apoptosis, que conduce a una diferenciación defectuosa del gránulo embrionario y las capas de células de Purkinje. La isquemia leve, las excitotoxinas, las hormonas, los corticosteroides y las citoquinas proinflamatorias pueden inducir, de forma similar, la muerte celular apoptótica. El virus de la rabia y el virus de la enfermedad de Borna se han relacionado experimentalmente con la muerte neuronal apoptótica (Miller & Zachary, 2017).

La apoptosis produce cambios morfológicos característicos en las células, como la contracción, la condensación citoplásmica y la formación de ampollas, y la aglutinación y fragmentación de la cromatina. A medida que las células continúan encogiéndose, la cromatina nuclear se escinde en unidades más pequeñas y junto con el citoplasma condensado se empaqueta para su eliminación por parte de los macrófagos. La apoptosis no induce respuesta inflamatoria.

La necrosis es un proceso que generalmente afecta a grupos de células, a diferencia de lo que se describió para la apoptosis. Se caracteriza por la siguiente secuencia: degeneración hidrópica, hinchazón de las mitocondrias, pérdida del control del gradiente iónico a través de la membrana celular, activación de numerosas enzimas citoplásmicas y lisosómicas, picnosis y fragmentación del núcleo, y eventual lisis celular. Los restos celulares asociados con la muerte neuronal necrótica provocan una respuesta inflamatoria (Miller & Zachary, 2017).

La necrosis neuronal aguda refiere a los primeros marcadores morfológicos de la muerte celular neuronal. Este proceso es evidente, aproximadamente, entre las 12-24 horas después de una injuria irreversible. Las características morfológicas consisten en la contracción del cuerpo celular, los núcleos picnóticos, la desaparición del nucléolo y la pérdida de la sustancia de Nissl, con eosinofilia intensa del citoplasma. La lesión neuronal subaguda y crónica ("degeneración") se refiere a la muerte neuronal que ocurre como resultado de una enfermedad progresiva de cierta duración, como se ve en ciertas enfermedades neurodegenerativas que evolucionan lentamente. El signo histológico característico es la pérdida de células, a menudo de forma selectiva, que involucra grupos de neuronas funcionalmente relacionadas y gliosis reactiva. En una etapa temprana, la pérdida de células es difícil de detectar; los cambios gliales reactivos asociados a menudo son el mejor indicador de lesión neuronal (Frosch *et al.*, 2015).

Por otro lado, la reacción axonal es un cambio observado en el cuerpo celular durante la regeneración del axón. Este proceso se ve mejor en las células del asta ventral de la médula espinal, cuando los axones motores se cortan o se dañan significativamente. Hay una mayor síntesis de proteínas asociada con la germinación axonal. Esto se refleja en la ampliación y el redondeo del cuerpo celular, el desplazamiento periférico del núcleo, la ampliación del nucléolo y la

dispersión de la sustancia de Nissl, desde el centro hacia la periferia de la célula (Frosch *et al.*, 2015).

En los animales domésticos, la muerte neuronal y la pérdida de neuronas pueden ocurrir como resultado de procesos de enfermedad progresiva de larga duración en el SNC. Esta pérdida, llamada atrofia neuronal simple, se observa en enfermedades neurológicas lentamente progresivas, como la atrofia cerebral cortical del envejecimiento, la lipofuscinosis cerioidea y diversas manifestaciones de la degeneración neuronal selectiva o multisistémica. Las lesiones macroscópicas generalmente no son visibles, pero cuando las neuronas cerebrocorticales mueren, las circunvoluciones cerebrales se pueden atrofiar, lo que resulta en un ensanchamiento de los surcos. Las lesiones microscópicas indicativas de una pérdida más temprana de neuronas incluyen números disminuidos de neuronas, astrogliosis y atrofia y pérdida de neuronas en sistemas funcionalmente relacionados. La pérdida de neuronas, a lo largo del tiempo, provoca un deterioro progresivo de la función neurológica, ya que las neuronas aferentes y eferentes, que interactúan directamente con la neurona ahora muerta, se afectan de forma similar y eventualmente degeneran (Miller & Zachary, 2017).

En los seres humanos, el daño neuronal puede estar asociado con una amplia gama de alteraciones subcelulares en los orgánulos neuronales y el citoesqueleto. Las inclusiones neuronales pueden ocurrir como una manifestación del envejecimiento cuando se producen acumulaciones intracitoplásmicas de lípidos complejos (lipofuscina), proteínas o carbohidratos. La deposición citoplásmica anormal de lípidos complejos y otras sustancias también se produce en trastornos genéticos del metabolismo, en los que se acumulan sustratos o productos intermedios. La infección viral puede conducir a inclusiones intranucleares anormales, como se observa en la infección herpética; inclusiones citoplásmicas, como se observa en la rabia, o en el núcleo

y el citoplasma, como se describe en la infección por citomegalovirus. Algunas enfermedades degenerativas del SNC se asocian con inclusiones intracitoplasmáticas neuronales, como ovillos neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer y cuerpos de Lewy de la enfermedad de Parkinson (Frosch *et al.*, 2015).

1.2.2 Reacciones de las células de la glía a la lesión

Los astrocitos muestran principalmente cambios morfológicos, con hipertrofia del citoplasma, acumulación de GFAP e hiperplasia; mientras que la microglía prolifera y se acumula en respuesta a una lesión.

1.2.2.1 Astrocitos

Las reacciones astrocíticas comunes en las lesiones del SNC son hinchazón, hipertrofia, división y el depósito de filamentos intermedios en las prolongaciones celulares. El término astrocitosis denota que los astrocitos han aumentado en tamaño y número en respuesta a la lesión, mientras que el término astrogliosis implica la síntesis de filamentos intermedios y una mayor longitud, complejidad y ramificación de las prolongaciones astrocíticas. El reconocimiento de estas diferencias se basa en la evaluación histopatológica e inmunohistoquímica (Miller & Zachary, 2017).

1.2.2.2 Oligodendrocitos

La oligodendrogliosis reacciona ante las lesiones del SNC con hinchazón celular, hipertrofia y degeneración. Las células precursoras de la oligodendrogliosis pueden proliferar para reemplazar las células degeneradas. Microscópicamente, estas células se hinchan e hipertrofian alrededor de las neuronas lesionadas. Esta respuesta a la lesión se denomina satelitosis, aunque otras células gliales también pueden contribuir con este mismo patrón (Miller & Zachary, 2017).

1.2.2.3 Microglía

Las células de la microglia son las primeras células en el SNC que reaccionan a la lesión. La magnitud de su respuesta se correlaciona con la gravedad del daño. Las respuestas de la microglia a la lesión incluyen hipertrofia, hiperplasia, fagocitosis de restos celulares y de mielina y neuronofagia. Después de la lesión, la microglía progresa a través de una etapa de activación, convirtiéndose en células reactivas completamente inmunocompetentes. Estas células reactivas proliferan fácilmente, ya sea focalmente, formando nódulos gliales, o más difusamente, dependiendo de la naturaleza de la lesión (Miller & Zachary, 2017).

1.2.3 Principales causas de lesiones del SNC

Dado que las diferentes regiones cerebrales participan en diferentes funciones, el patrón de signos que se observará luego de una lesión dependerá, tanto de la región del sistema nervioso central involucrada, como también del proceso patológico en cuestión. Las neuronas maduras son incapaces de sufrir división celular, por lo que la destrucción de incluso un pequeño número de neuronas esenciales para una determinada función puede acarrear un déficit neurológico al individuo. A continuación, se presenta una breve reseña de las principales causas de lesiones del SNC, según Frosch *et al.*, 2015:

1.2.3.1 Edema cerebral, hidrocefalia; presión intracraneal elevada y hernia

El cerebro y la médula espinal están contenidos y protegidos por el cráneo y el raquis, que son rígidos. La presión dentro de la cavidad craneal puede elevarse en caso de edema cerebral generalizado o aumento del volumen de LCR (hidrocefalia). Dependiendo del grado y rapidez del aumento de la presión y la naturaleza de la lesión subyacente, las consecuencias van desde sutiles déficits neurológicos hasta la muerte.

1.2.3.2 Malformaciones y trastornos del desarrollo

Aunque la patogenia y la etiología de muchas malformaciones del SNC no se conocen aun, tanto las influencias genéticas como las ambientales parecen estar involucradas. La relación causal entre las alteraciones genéticas y la patogenia de las malformaciones es objeto de investigación activa. Además de los factores genéticos, muchos compuestos tóxicos y agentes infecciosos también tienen efectos teratogénicos y pueden causar malformaciones cerebrales.

1.2.3.3 Traumas

La ubicación anatómica de la lesión y la capacidad limitada para la reparación funcional son los principales determinantes de las consecuencias del trauma del SNC. Una lesión de varios centímetros cúbicos de tejido nervioso puede ser clínicamente silenciosa (si se encuentra en el lóbulo frontal), severamente incapacitante (si se encuentra en la médula espinal) o fatal (si se encuentra en el tronco encefálico).

La médula espinal es vulnerable a los traumatismos de su recubrimiento esquelético. La mayoría de las lesiones que dañan a la médula se asocian con el desplazamiento transitorio o permanente de la columna vertebral. El nivel de lesión de la médula espinal determinará la extensión de las manifestaciones neurológicas: las lesiones que afectan a las vértebras torácicas o caudales a estas pueden provocar paraplejia; las lesiones cervicales resultan en cuadriplejia; los que están por encima de C4 pueden, además, provocar compromiso respiratorio por parálisis del diafragma. El daño en la región de impacto a los tractos de materia blanca ascendentes y descendentes aísla a la médula espinal distal del resto del cerebro. Esta interrupción, junto con el daño localizado de la sustancia gris en el nivel del impacto, será la causa principal de los déficits neurológicos.

1.2.3.4 Injurias traumáticas vasculares

La lesión vascular es un componente frecuente del trauma del SNC. Es el resultado de un trauma directo y la interrupción de la pared de los vasos, y conduce a hemorragia en diferentes sitios anatómicos. Dependiendo de la ubicación anatómica del vaso lesionado, se puede producir una hemorragia en los compartimientos epidural, subdural, subaracnoideo o intraparenquimatoso, y a veces en combinación de estos.

1.2.3.5 Enfermedades cardiovasculares

Desde el punto de vista de la fisiopatología y la anatomía patológica, es conveniente considerar la enfermedad cerebrovascular como dos procesos: 1- Hipoxia, isquemia e infarto como resultado del deterioro del suministro de sangre y la oxigenación del tejido del SNC; en el cerebro, la embolia es más frecuente que la trombosis. Las lesiones pueden tener consecuencias globales o focales, con las manifestaciones clínicas determinadas por la región del cerebro afectada. 2-Hemorragia como resultado de la ruptura de vasos del SNC. Las etiologías comunes, al menos en los seres humanos, incluyen hipertensión y anomalías vasculares (aneurismas y malformaciones). Las hemorragias en los animales, por lo general obedecen a razones infecciosas inducidas por virus con afinidad por los endotelios.

1.2.3.6 Infecciones

Las infecciones pueden dañar al sistema nervioso directamente, a través de la lesión de neuronas o de la glía por el agente infeccioso, o indirectamente, a través de la acción de toxinas microbianas, los efectos destructivos de la respuesta inflamatoria o el resultado de mecanismos inmunomediados.

Existen distintas vías por las cuales los microorganismos pueden ingresar al sistema nervioso. La diseminación hematógena es la más común; los agentes

infecciosos normalmente obtienen acceso a través de la circulación arterial, pero la diseminación venosa retrógrada puede ocurrir a través de anastomosis con venas de la cara. La implantación directa de microorganismos suele ser traumática, aunque a veces se asocia con malformaciones congénitas como, por ejemplo, meningomielocelo, que proporcionan un acceso fácil para los microorganismos. La extensión local puede originarse a partir de estructuras adyacentes infectadas, como los senos paranasales, los dientes, el cráneo o las vértebras. Los virus también pueden ser transportados a lo largo del sistema nervioso periférico como ocurre con la rabia y el virus del herpes zóster.

1.2.3.7 Enfermedades por priones

Los priones son formas anormales de una proteína celular, que causan trastornos neurodegenerativos rápidamente progresivos y que pueden ser esporádicos, familiares o transmitidos. Este grupo de enfermedades incluye la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal y el kuru en humanos; tembladera en ovejas y cabras; encefalopatía transmisible del visón; enfermedad de desgaste crónica de ciervos y alces; y encefalopatía espongiiforme bovina. Estos trastornos comparten una base etiológica, ya que están asociados con formas anormales de una proteína específica denominada: proteína priónica (PrP). Todos ellos se caracterizan, morfológicamente, por "cambios espongiiformes", a consecuencia de la presencia de vacuolas intracelulares en neuronas y glía, y clínicamente por trastornos neurológicos rápidos y progresivos.

1.2.3.8 Enfermedades metabólicas genéticas

La interrupción de los procesos metabólicos en las neuronas y la glía, particularmente de aquellos involucrados en vías de síntesis o degradación, que son específicas del sistema nervioso, resultan en enfermedades que, por lo general, se presentan en estadios tempranos de la vida y el desarrollo. Algunos

de estos trastornos se manifiestan en el período postnatal inmediato, mientras que otros surgen en forma posterior, durante el desarrollo. En general, las formas de estas enfermedades, con un inicio más temprano, tienden a generar cursos clínicos más rápidos y agresivos.

1.2.3.9 Enfermedades metabólicas tóxicas y adquiridas

Las enfermedades metabólicas tóxicas y adquiridas son causas relativamente comunes de enfermedades neurológicas. Incluyen las causadas por deficiencias de vitaminas, secuelas neurológicas de enfermedades metabólicas y desórdenes tóxicos.

1.2.3.10 Tumores

Mientras que los patólogos han desarrollado esquemas de clasificación que distinguen entre lesiones benignas y malignas en base a la histología, el curso clínico de un paciente con un tumor cerebral está fuertemente influenciado por los patrones de crecimiento y ubicación. Por lo tanto, algunos tumores gliales con características histológicas de bajo grado (baja tasa mitótica, uniformidad celular y crecimiento lento) infiltran grandes regiones de cerebro y conducen a déficits clínicos serios y mal pronóstico. Debido a esta capacidad de infiltrar difusamente las sustancias gris y blanca, un tumor puede no ser compatible con la resección quirúrgica, sin comprometer la función neurológica. Además, cualquier neoplasia del SNC, independientemente de la histología, grado o clasificación, puede tener consecuencias letales si se halla situada en una región crítica del cerebro o la médula. Los tumores del SNC son capaces de propagarse a través del LCR si invaden el espacio subaracnoideo y, por lo tanto, pueden estar asociados con la implantación a lo largo del cerebro y la médula espinal, a distancia desde el sitio de origen.

1.2.3.11 Enfermedades desmielinizantes

Son afecciones adquiridas que se caracterizan por un daño preferencial a la mielina, con preservación relativa de los axones. Los déficits clínicos se deben al efecto de la pérdida de mielina en la transmisión de impulsos eléctricos a lo largo de los axones. La historia natural de las enfermedades desmielinizantes está determinada, en parte, por la capacidad limitada del SNC para regenerar la mielina normal y por el grado de daño secundario a los axones, que ocurre a medida que la enfermedad sigue su curso.

Varios procesos patológicos pueden causar pérdida de mielina. Estos incluyen la destrucción de la mielina mediada por el sistema inmune, como en la esclerosis múltiple, y las infecciones. Además, los trastornos hereditarios pueden afectar la síntesis o el recambio de los componentes de la mielina (leucodistrofias).

1.2.3.12 Enfermedades neurodegenerativas

Son trastornos caracterizados por la pérdida progresiva de neuronas, que afectan típicamente grupos de neuronas con relaciones funcionales, incluso si no son inmediatamente adyacentes. Por lo tanto, diferentes enfermedades tienden a involucrar sistemas neuronales particulares y, por ende, tienen signos y síntomas de presentación relativamente estereotipados.

Seguidamente, se exponen brevemente las principales características de las enfermedades neurodegenerativas más relevantes que afectan al ser humano y a los animales domésticos. Se describirán en primer lugar aquellas que afectan al cerebro, seguidas de aquellas que afectan a la médula espinal.

1.2.3.12.1 Enfermedades neurodegenerativas relevantes que afectan al cerebro

Enfermedad de Alzheimer

Esta es la enfermedad neurodegenerativa más común de los seres humanos. Se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas colinérgicas y la deficiencia desproporcionada del neurotransmisor acetilcolina (Standaert & Young, 2007), que conduce a la aparición de alteraciones motoras, de la conducta y cognitivas graves (Godoy *et al.*, 2014). Se observa atrofia cerebral (Fig. 1.24) asociada a la pérdida de neuronas y sinapsis.

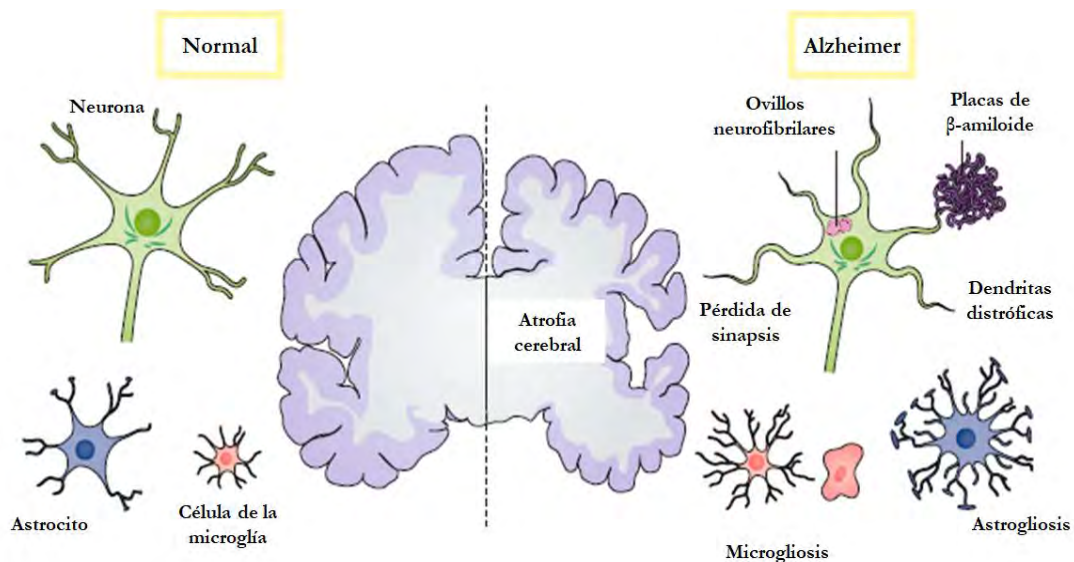


Figura 1.24. Características distintivas patológicas definitorias de la enfermedad de Alzheimer. Se caracteriza por atrofia cerebral asociada con la pérdida de sinapsis y neuronas. A nivel microscópico, se observa el depósito de placas de amiloide- β extracelulares y ovillos neurofibrilares intraneuronales, en asociación con neuritas distróficas y pérdida de sinapsis, así como microgliosis y astrogliosis. Modificado de Congdon & Sigurdsson, 2018.

A nivel microscópico, dos procesos se constituyen como característicos en su patogenia: el depósito de placas extracelulares, compuestas principalmente de β amiloide, y los ovillos neurofibrilares intraneuronales de proteína tau, asociados con neuritas distróficas y pérdida de sinapsis, microgliosis y astrogliosis (Šerý *et*

al., 2013; Congdon & Sigurdsson, 2018). El aumento del estrés oxidativo y las formaciones de proteína mal plegadas son las bases de esta enfermedad. El metabolismo energético reducido en el cerebro, en particular relacionado con bajos niveles de glucosa, es una de las anomalías metabólicas mejor documentadas en esta enfermedad. Los déficits en la función mitocondrial y el aumento de la acumulación de β amiloide en las sinapsis, conducen a una actividad sináptica reducida y al consiguiente daño neuronal (*Godoy et al.*, 2014).

Enfermedad de Parkinson

Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. Se postula que su etiología involucra componentes genéticos, así como también factores ambientales (*Andalib et al.*, 2014; *Badger et al.*, 2014). El comienzo de la enfermedad es variable, ya que puede afectar tanto a personas jóvenes, de mediana edad, o ancianos, siendo más común su inicio en etapas tardías de la vida (*Badger et al.*, 2014). Independientemente de su comienzo, la patogenia es similar en todos los casos y los síntomas derivan del desbalance entre los neurotransmisores acetilcolina y dopamina, a raíz de la degeneración y pérdida de neuronas dopaminérgicas (subtipo A9) de la sustancia nigra mesencefálica (**Fig. 1.25**).

Estas neuronas están involucradas en el control de la función motora en el ganglio basal, y su pérdida se traduce en la falta de control fino que ocasionan los típicos temblores (evidentes en reposo), bradiquinesia y trastornos de la marcha (*Badger et al.*, 2014). Los pacientes también sufren trastornos neuropsiquiátricos de moderados a severos, tales como desórdenes del habla, el humor, el sueño, entre otros. La causa de la pérdida de estas neuronas no está definida aún, pero se postulan varios mecanismos, entre ellos la acumulación intraneuronal de la proteína α -sinucleína (SNCA). Los agregados de esta

proteína generan inclusiones neuronales denominadas cuerpos de Lewy (Andalib *et al.*, 2014).

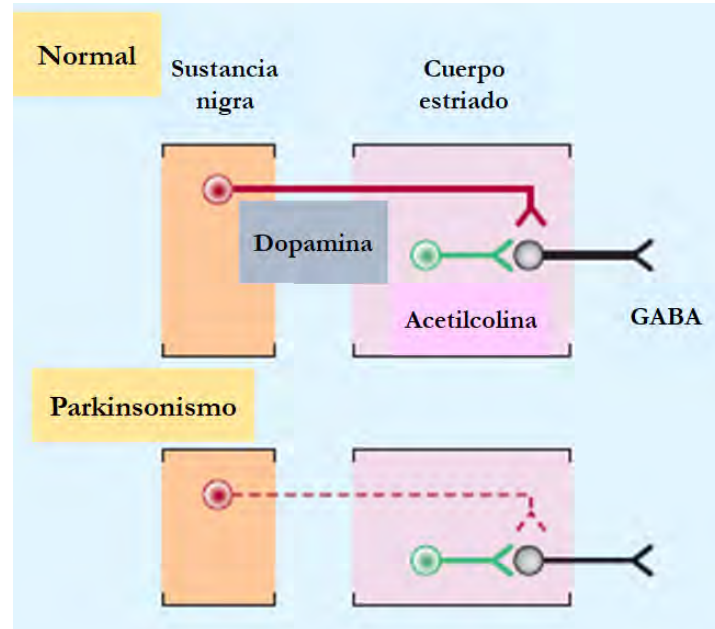


Figura 1.25. Representación esquemática de la secuencia de neuronas involucradas en el parkinsonismo. Arriba: las neuronas dopaminérgicas (rojas) que se originan en la sustancia nigra normalmente inhiben la salida GABAérgica del cuerpo estriado, mientras que las neuronas colinérgicas (verdes) ejercen un efecto excitador. Abajo: en el parkinsonismo, hay una pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas (discontinuas, rojas). Modificado de Aminoff, 2015.

1.2.3.12.2 Enfermedades neurodegenerativas relevantes que afectan a la médula espinal

En los seres humanos

Esclerosis lateral amiotrófica

Es una enfermedad neurodegenerativa que se inicia en la adultez temprana y se caracteriza por degeneración selectiva de neuronas motoras de la corteza cerebral y de la médula espinal (Calvo *et al.*, 2014). Como consecuencia de esto, se produce una parálisis progresiva, que lleva a la muerte en un promedio de entre 3-5 años (Rao *et al.*, 2004). Es la enfermedad neurodegenerativa más

común que afecta a las neuronas motoras (Castanedo-Vazquez *et al.*, 2018). Tanto las neuronas motoras superiores (cerebrales), como inferiores (medulares), sufren degeneración o mueren a causa de esta enfermedad y, como consecuencia, se pierde la comunicación entre las neuronas y el músculo, llevando a debilidad progresiva y fasciculaciones (Calvo *et al.*, 2014). Este síndrome parece ser el resultado de un complejo entramado de factores, incluyendo al estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplasmático, la desregulación de la transcripción de ARN, la excitotoxicidad, la apoptosis, la inflamación y la susceptibilidad genética. Los casos hereditarios representan un pequeño porcentaje (5-10 %), dentro de los cuales, aproximadamente el 20 % se relacionan con una mutación de la enzima superóxido dismutasa (gen SOD 1) (Calvo *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2004).

Esclerosis múltiple

Es una enfermedad crónica del sistema nervioso central caracterizada por la pérdida de las funciones motora y sensorial, como resultado de inflamación inmunomediada, desmielinización y el subsecuente daño axonal (Karussis, 2014). La Organización Mundial de la Salud, estima que más de dos millones de personas en todo el mundo sufren esta enfermedad que hoy en día es una de las causas más comunes de discapacidad neurológica de origen no traumático en adultos jóvenes (Karussis, 2014, Rahmanzadeh *et al.*, 2018). Clínicamente, la mayoría de los pacientes experimentan episodios recurrentes (recaídas) de deterioro neurológico, pero en la mayoría de los casos (60-80 %) el curso de la enfermedad se vuelve crónico y progresivo con el tiempo, lo que lleva a una discapacidad motriz y déficit cognitivos acumulativos (Karussis, 2014). En la mayoría de los pacientes, las manifestaciones clínicas indican la participación de los sistemas motores, sensoriales, visuales y autonómicos, pero pueden aparecer otros síntomas y signos. Pocas de las características clínicas son específicas de la enfermedad, excepto por el síntoma de Lhermitte (sensación eléctrica que

baja por la columna vertebral o las extremidades en la flexión del cuello) y el fenómeno Uhthoff (empeoramiento transitorio de síntomas y signos cuando aumenta la temperatura corporal central, como después del ejercicio o de un baño caliente) (Compston & Coles, 2008).

Histológicamente, en las fases tempranas de la enfermedad, se hacen evidentes las lesiones inflamatorias perivenulares (que consisten en infiltraciones mononucleares), que dan como resultado la aparición de placas desmielinizantes, el sello patológico de esta enfermedad. La inflamación conduce al daño de los oligodendrocitos y a la desmielinización, interrumpiendo el relevo de las señales neuronales en las regiones afectadas. Conforme la enfermedad progresa, la discapacidad y el daño neuronal se vuelven permanentes e irreversibles (Karussis, 2014).

En los animales domésticos

Mielopatía degenerativa canina

La mielopatía degenerativa canina (MDC) ha sido reconocida durante más de 40 años como de ocurrencia espontánea, como un desorden neurodegenerativo de la médula espinal con comienzo en la adultez, y caracterizada por la pérdida progresiva de las funciones motoras (Nardone *et al.*, 2016). El comienzo de la enfermedad tiene lugar en perros con un promedio de 9 años de edad. Los animales afectados sufren ataxia insidiosa y progresiva, y paresia de las extremidades pélvicas, lo que conduce a la paraplejia y finalmente a la muerte (Coates *et al.*, 2007). Si bien la enfermedad puede extenderse por más de tres años, usualmente los propietarios deciden someterlos a la eutanasia, en tiempo promedio al año del inicio, al momento de presentarse la paraplejia de los animales (Nardone *et al.*, 2016). La localización neuroanatómica temprana de la lesión muestra el daño entre la T3 y la L3 (Coates *et al.*, 2007). Si bien se consideró inicialmente una enfermedad propia de la raza Ovejero Alemán y

actualmente es especialmente prevalente en perros de la raza Boxer y de la raza Corgi galés de Pembroke, desde su descripción inicial fue diagnosticada en varias otras razas, tales como Perro Crestado Rodesiano, Husky siberiano, Caniche miniatura, Setter irlandés, Dálmata y Weimaraner, entre otras. La MDC comparte grandes similitudes con algunas formas de la esclerosis múltiple en humanos; por ejemplo, la distribución de las lesiones y la progresión. Por esta razón, la MDC representa el primer modelo animal de ocurrencia natural para la enfermedad humana (Nardone *et al.*, 2016).

Enfermedad de la neurona motora

La expresión de “enfermedad de la neurona motora” se utiliza en medicina veterinaria para describir trastornos degenerativos de neuronas motoras α . Estas enfermedades que afectan a las neuronas motoras, también conocidas como neuronopatías motoras, son tan devastadoras como infrecuentes, y han sido descritas, predominantemente, en perros, gatos, vacas, caballos y cerdos (Miller & Zachary, 2017). Causan la degeneración tanto del cuerpo de la célula neuronal como de su axón (Olby., 2004). Las lesiones características son la degeneración y pérdida de neuronas motoras en el asta ventral medular, degeneración axonal variable de las raíces ventrales espinales y los nervios periféricos. En algunos de estos trastornos se observa una marcada hinchazón de los cuerpos neuronales en el asta ventral, de los axones o de ambos, asociada a una acumulación excesiva de neurofilamentos (Miller & Zachary, 2017). La pérdida de neuronas motoras resulta en debilidad progresiva del animal, con atrofia muscular, a menudo acompañada de temblores y fasciculaciones. El inicio de los signos en animales que están en crecimiento puede dar lugar a deformaciones angulares de las extremidades, a medida que se desarrollan las contracturas musculares. En última instancia, los reflejos espinales disminuyen y finalmente se pierden. Sin embargo, esto ocurre tarde en el curso de la enfermedad, ya que los reflejos pueden provocarse mientras haya neuronas

funcionales supervivientes. Existe creciente evidencia que señala a la excitotoxicidad como un factor crucial para la pérdida selectiva de neuronas motoras. Una posible explicación para esto lo constituye la mayor cantidad de receptores AMPA/kainato permeables a calcio que poseen estas neuronas. La entrada rápida de calcio a través de estos canales conduciría a un daño mitocondrial y generación de radicales libres. La acumulación de estas especies reactivas de oxígeno ocasionaría daños sobre los astrocitos circundantes, que reducirían la captación de glutamato. Como resultado, la concentración extracelular de glutamato se incrementaría en forma marcada y se exacerbaría toda la situación (Olby, 2004).

En bovinos, existe una enfermedad conocida como síndrome “*shaker*”, que ha sido descrita en terneros de la raza Hereford. Cursa con pérdida de neuronas motoras, y marcada acumulación de neurofilamentos en las neuronas del SNC, SNP y autónomo. Todos los segmentos de la médula espinal se ven severamente afectados. Hay degeneración Walleriana en las raíces ventrales nerviosas y la sustancia blanca de la médula espinal. El trastorno ocurre en terneros recién nacidos y se caracteriza, clínicamente, por sacudidas trémulas de la cabeza, el cuerpo y la cola (Miller & Zachary, 2017).

Existen reportes de trastornos de neuronas motoras de origen hereditario en perros, como es el caso de la atrofia muscular espinal hereditaria en la raza Spaniel bretón, la atrofia neuromuscular progresiva hereditaria en perros Pointer ingleses, la atrofia muscular espinal en perros pastor alemán y en Rottweilers, la enfermedad de la neurona motora en Doberman Pinschers y la abiotrofia neuronal hereditaria en perros suecos de Laponia (Olby, 2004).

En gatos, se registran pocos casos de trastornos motores, la mayoría de ellos descritos en animales seniles y de forma adquirida.

La enfermedad de neuronas motoras en equinos es un trastorno neuromuscular raro, esporádico y adquirido, que afecta a equinos adultos de variadas razas,

causando pérdida de peso, debilidad y atrofia muscular. No se conocen asociaciones respecto a edad, familias o predisposición genética (Miller & Zachary, 2017). Hallazgos histopatológicos han revelado que la degeneración y la pérdida de neuronas en el tronco encefálico y la médula espinal son similares a aquellos encontrados en humanos con esclerosis lateral amiotrófica esporádica (Sasaki *et al.* 2016), y a la atrofia muscular progresiva en humanos (Mohammed *et al.*, 2012).

Espondilomielopatía cervical

La espondilomielopatía cervical (en inglés, *cervical spondylomyelopathy* - CSM), fue inicialmente descrita en 1967. Es una enfermedad común de la médula espinal de las razas de perros grandes y gigantes (Queen *et al.*, 1998; da Costa, 2010). Se caracteriza por compresión dinámica y estática de la médula espinal cervical, de las raíces nerviosas o ambas cosas, lo que lleva a grados variables de déficits neurológicos y dolor de cuello (da Costa, 2010). La presentación clínica incluye ataxia de extremidades posteriores, déficits propioceptivos, paresia y transporte bajo de la cabeza (Queen *et al.*, 1998). Su patogenia, diagnóstico y tratamiento aún son motivo de controversia. La CSM canina tiene similitudes con la mielopatía espondilótica cervical de los seres humanos. La raza Doberman se ha propuesto como un modelo natural para estudiar esta enfermedad en humanos.

La etiología es aún desconocida, aunque se han propuesto varias causas tales como genéticas, congénitas, conformación corporal y nutricionales. Tradicionalmente, la compresión de la médula espinal se ha pensado como un factor clave para los signos de la CSM (**Fig. 1.26**). Un hallazgo distintivo que permite diferenciar entre animales normales o afectados es la estenosis del canal vertebral. Los perros Doberman clínicamente normales, poseen un canal vertebral grande. Un canal más pequeño reduce el umbral para que los efectos acumulativos de varias estructuras que invadan la médula espinal causen signos

de mielopatía. Aunque las técnicas quirúrgicas ofrecen una tasa de éxito de alrededor del 80 %, el índice de mejora con el tratamiento médico es aceptable, y en ocasiones es preferido por los propietarios a causa de las preocupaciones acerca de los riesgos anestésicos y quirúrgicos, predominantemente en la raza Doberman, a causa de la alta incidencia de miocardiopatía dilatada en esa raza. La restricción del ejercicio es clave en este tratamiento médico para minimizar las actividades de alto impacto que podrían exacerbar el componente dinámico de la compresión de la médula espinal (da Costa, 2010).

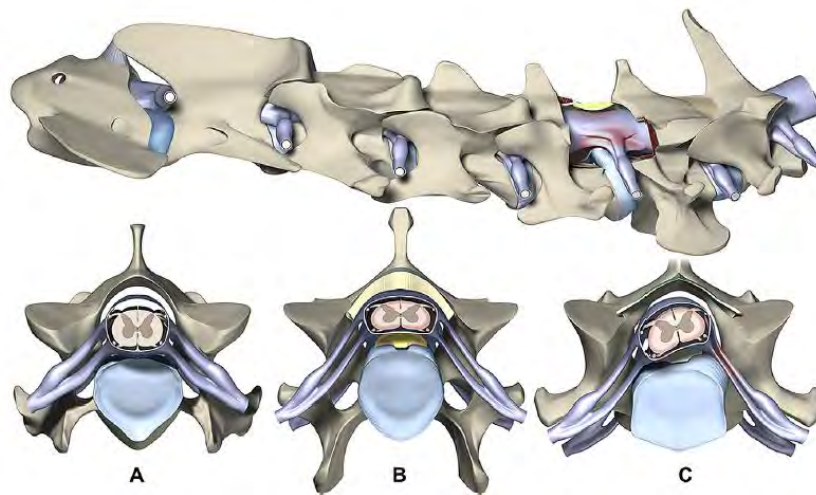


Fig. 1.26. Arriba: Compresión ventral de la médula espinal y compresión de la raíz nerviosa en C5-C6 causada por la protrusión del disco intervertebral. Dorsalmente, la hipertrofia del ligamento amarillo produce una compresión leve de la médula espinal. Abajo: (A) Sección transversal a nivel de la región del disco C4-C5, que muestra la médula espinal normal y el canal vertebral. (B) Compresión ventral en la región C5-C6, causada por la protrusión del disco intervertebral y la hipertrofia del ligamento longitudinal dorsal (amarillo) y ligamento amarillo (que causa compresión dorsal leve). (C) Protrusión asimétrica del disco intervertebral en C6-C7, que causa compresión de la médula espinal y la raíz nerviosa. Extraído de da Costa (2010).

1.3 Excitotoxicidad

De las descripciones previas se desprende que los trastornos neurodegenerativos constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades con

diferentes presentaciones clínicas y etiologías, tanto en la medicina veterinaria como en la medicina humana.

El papel de la excitotoxicidad ha incrementado su aceptación como crucial para el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, aun cuando los mecanismos subyacentes no se conozcan con detalle. El término excitotoxicidad, que fue introducido inicialmente por John Olney en el año 1969 (Plitman *et al.*, 2014), define a la muerte celular como consecuencia de la acción tóxica de aminoácidos excitatorios. Dado que el glutamato ($C_5H_9NO_4$) es el neurotransmisor de mayor relevancia para la función normal del encéfalo y el neurotransmisor excitatorio más abundante en el SNC (casi todas las neuronas excitatorias del SNC son glutamatérgicas y se estima que más del 50 % de todas las sinapsis del encéfalo liberan este agente) (Zhuo, 2017), la excitotoxicidad neuronal hace referencia, casi exclusivamente, a la injuria y la muerte de neuronas a causa de la exposición prolongada a glutamato y al flujo excesivo de iones hacia el interior de la célula (Dong *et al.*, 2009, Purves *et al.*, 2004).

El glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, debe ser sintetizado en las neuronas a partir de precursores locales (**Fig. 1.27**). El precursor más importante para la síntesis de glutamato es la glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$), que es liberada por las células gliales. Una vez liberada, la glutamina es captada en las terminaciones presinápticas y metabolizada a glutamato por la enzima mitocondrial glutaminasa. El glutamato también puede ser sintetizado por transaminación de 2-oxoglutarato, un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por ende, algo de la glucosa metabolizada por las neuronas también puede ser utilizada para la síntesis de glutamato (Purves *et al.*, 2004).

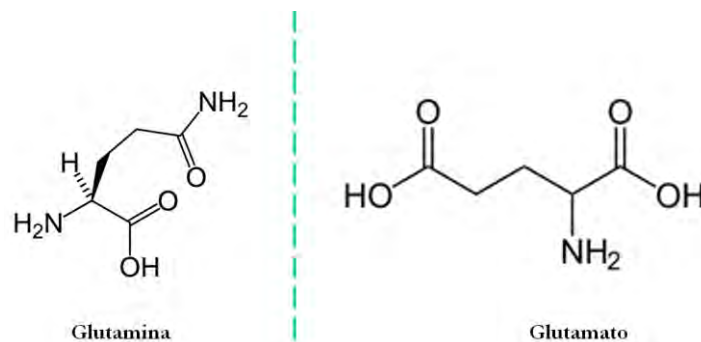


Figura 1.27. Fórmulas estructurales del neurotransmisor glutamato (derecha) y su precursor, glutamina (izquierda).

El glutamato sintetizado en el citoplasma presináptico es empaquetado en vesículas sinápticas por transportadores, denominados VGLUT. Una vez liberado, es eliminado de la hendidura sináptica por los transportadores de aminoácidos excitadores (del inglés *excitatory amino acid transporters* - EAAT). Existen cinco tipos diferentes de transportadores de glutamato de alta afinidad, algunos de los cuales están presentes en las células gliales y otros en las terminaciones presinápticas. El glutamato captado por las células gliales es convertido en glutamina por la enzima glutamina sintetasa; la glutamina es transportada luego fuera de las células gliales y hacia el interior de las terminaciones nerviosas. Así, las terminaciones sinápticas cooperan con las células gliales para mantener un aporte adecuado del neurotransmisor; esta secuencia se denomina ciclo del glutamato-glutamina (**Fig. 1.28**) ([Purves *et al.*, 2004](#)).

Los efectos excitatorios del glutamato se ejercen a través de la activación de tres tipos principales de receptores ionotrópicos y varias clases de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (**Fig. 1.29**).

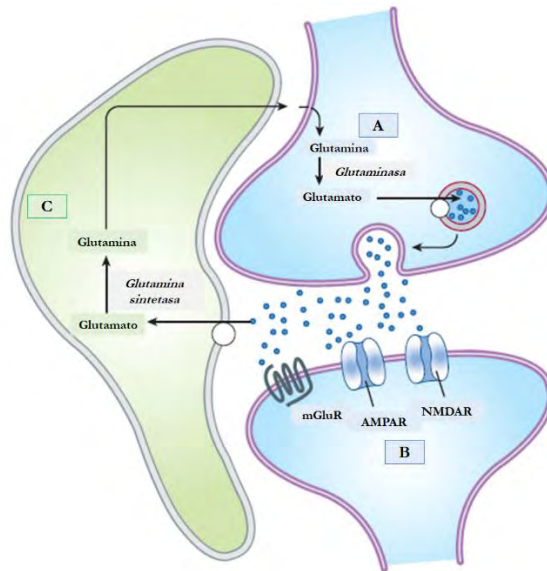


Figura 1.28. Representación esquemática de una sinapsis glutamatérgica. La glutamina se importa a la neurona glutamatérgica (A) y se convierte en glutamato a través de la acción de la enzima glutaminasa. El glutamato se concentra luego en vesículas mediante el transportador de glutamato vesicular. Tras la liberación en la sinapsis, el glutamato puede interactuar con los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA (AMPA, NMDAR) y con los receptores metabotrópicos (mGluR) en la célula postsináptica (B). La transmisión sináptica finaliza mediante el transporte activo del glutamato hacia una célula glial (C) vecina, mediante un transportador de glutamato. En la célula glial, el glutamato se convierte en glutamina mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa y se transporta de vuelta a la terminal del axón presináptico. Modificado de [Gray & Nicoll, 2015](#).

Los receptores ionotrópicos son los denominados receptores de NMDA, receptores de AMPA y receptores de kainato. Estos receptores ionotrópicos son canales iónicos operados por ligando y permeables a varios cationes. Sus nombres derivan de los agonistas que los activan: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) y ácido kaínico (KA) (ácido (2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil)-acético monohidrato) ([Dong *et al.*, 2009](#)).

Todos los receptores ionotrópicos de glutamato son canales iónicos no selectivos que permiten el pasaje de Na^+ y de K^+ , y en algunos casos, de pequeñas cantidades de Ca^{+2} . Por ende, la activación de estos receptores siempre produce respuestas pos-sinápticas excitadoras ([Purves *et al.*, 2004](#)).

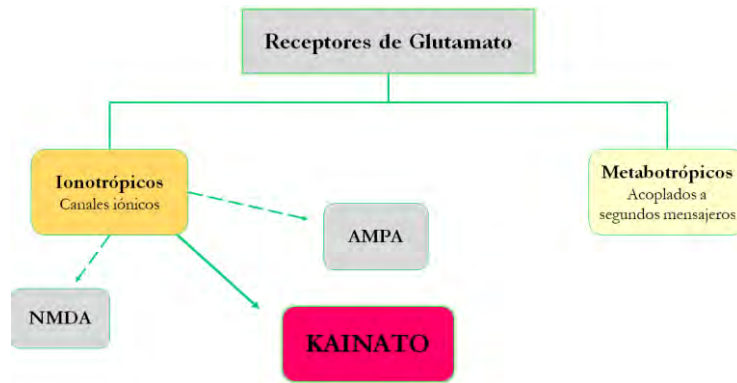


Figura 1.29. Clasificación de los diferentes receptores para glutamato, y subtipos de receptores ionotrópicos.

Los receptores NMDA son canales iónicos permeables al Ca^{+2} que se expresan en la mayor parte de las neuronas centrales. Los receptores AMPA y KA median la despolarización rápida de casi todas las sinapsis glutamatérgicas en el encéfalo y la médula espinal. La activación continua de un gran número de receptores NMDA lleva a un incremento de los niveles de calcio intracelular y de la actividad catabólica de las enzimas, lo cual desata una cascada de eventos que conducen habitualmente a apoptosis y necrosis (Dong *et al.*, 2009; Plitman *et al.*, 2014).

Los receptores de tipo AMPA también están implicados en la excitotoxicidad, ya que son altamente permeables al Ca^{+2} y, posiblemente, contribuyen con los procesos de muerte neuronal retardada inducidos por el incremento de Ca^{+2} .

Aunque los mecanismos exactos por los cuales suceden estos fenómenos son parcialmente conocidos, está demostrado que el aumento del flujo de Ca^{+2} está fuertemente implicado (Plitman *et al.*, 2014).

En definitiva, la sobreestimulación de los receptores de glutamato dificulta la homeostasis del calcio celular y activa la síntesis de óxido nítrico, la generación de radicales libres de oxígeno y la muerte celular programada. El incremento resultante de Ca^{+2} es particularmente neurotóxico, desencadenando la activación de enzimas que degradan proteínas, membranas y ácidos nucleicos (Dong *et al.*, 2009).

1.3.1 Ácido kaínico

El ácido kaínico (KA, ácido acético-2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil, $C_{10}H_{15}NO_4$, PM:213,23), es un análogo cíclico estable del L-glutamato y agonista de los receptores ionotrópicos de tipo KA para este neurotransmisor (**Fig. 1.30**). Fue aislado y extraído a partir del alga *Digenea simplex*, un alga roja hallada en aguas tropicales y subtropicales, por Murakami y colaboradores, en 1953 (Lévesque & Avoli, 2013). Fue inicialmente utilizado como ascaricida, pero posteriormente se verificó que producía respuestas excitatorias prolongadas en neuronas corticales luego de la aplicación iontoforética, lo que condujo a su utilización como un análogo potente del glutamato, que producía despolarización y eventualmente muerte celular (Lévesque & Avoli, 2013). Hoy en día es considerado un agente excitotóxico eficaz para lesionar las redes neuronales de todos el SNC, y proporciona un modelo que permite investigar los mecanismos básicos de lesión en la médula espinal (Kuzhandaivel *et al.*, 2010). Varios estudios sugieren que la estimulación de receptores de glutamato no-NMDA con KA puede inducir autofagia y activación de enzimas lisosomales; que, a su vez, juegan un importante papel en las lesiones neuronales excitotóxicas (Dong *et al.*, 2009).

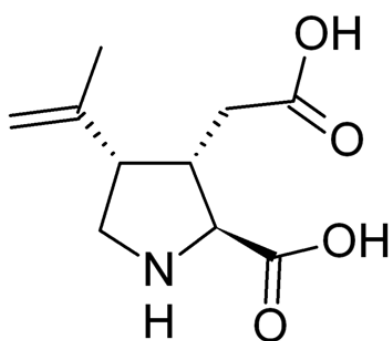


Figura 1.30. Fórmula estructural del ácido kaínico.

1.4 Excitotoxicidad e injuria de la médula espinal

La excitotoxicidad es la principal contribuyente de la fisiopatología de la injuria aguda de la médula espinal. La injuria de la médula espinal se puede definir como un daño resultante de un insulto infligido a la médula espinal que causa la pérdida, completa o no, en forma temporal o permanente, de sus principales funciones motoras, sensoriales y autónomas (Mazensky *et al.*, 2017). Es un proceso complejo, que se inicia con una lesión primaria, seguida de daño amplificado por la liberación excesiva de glutamato, la producción de radicales libres de oxígeno y disfunción metabólica (Mazzone *et al.*, 2010). La “injuria primaria” se puede dividir en insultos traumáticos o no traumáticos. Los insultos traumáticos son el resultado de un evento traumático endógeno o exógeno sobre la médula espinal, tal como sucede cuando la médula espinal es lacerada, comprimida, sufre contusión o infarto; el fallo en la integridad biomecánica de la médula conduce a fuerzas compresivas que resultan en disrupción de axones, vasos sanguíneos, y membranas celulares (Witiw & Fehlings, 2015). Los insultos no traumáticos se pueden incluir en varias categorías: vasculares, cancerosos, infecciosos, degenerativos y congénitos (Mazensky *et al.*, 2017).

Esa injuria primaria lleva a una cascada de eventos biológicos, descritos como “injuria secundaria”, que ocurre en el lapso desde minutos a semanas y lleva a mayor daño neurológico (Silva *et al.*, 2014). En segundos, la disrupción de la microvasculatura causa hemorragia y edema, que impiden la perfusión de la médula traumatizada. La trombosis y el vasoespasma resultantes exacerban la isquemia. La necrosis de las membranas celulares se produce como consecuencia de la disrupción mecánica, con liberación concomitante de glutamato (que puede alcanzar niveles excitotóxicos) y la desregulación iónica por el flujo de Na^+ y Ca^{+2} . Los mecanismos de la fase de injuria secundaria se

separan, conceptualmente, en fase inmediata (hasta 2 horas pos-injuria), aguda temprana (hasta 48 horas pos-injuria), y subaguda (hasta 2 semanas pos-injuria) (**Fig. 1.31**) (Witiw & Fehlings, 2015). Finalmente, comienza la fase crónica, que puede durar hasta años después de la injuria (Silva *et al.*, 2014). Es en las fases tempranas, donde la administración de agentes neuroprotectores y neuroregenerativos se postulan como una gran promesa para alterar la recuperación neurológica y funcional (Witiw & Fehlings, 2015).

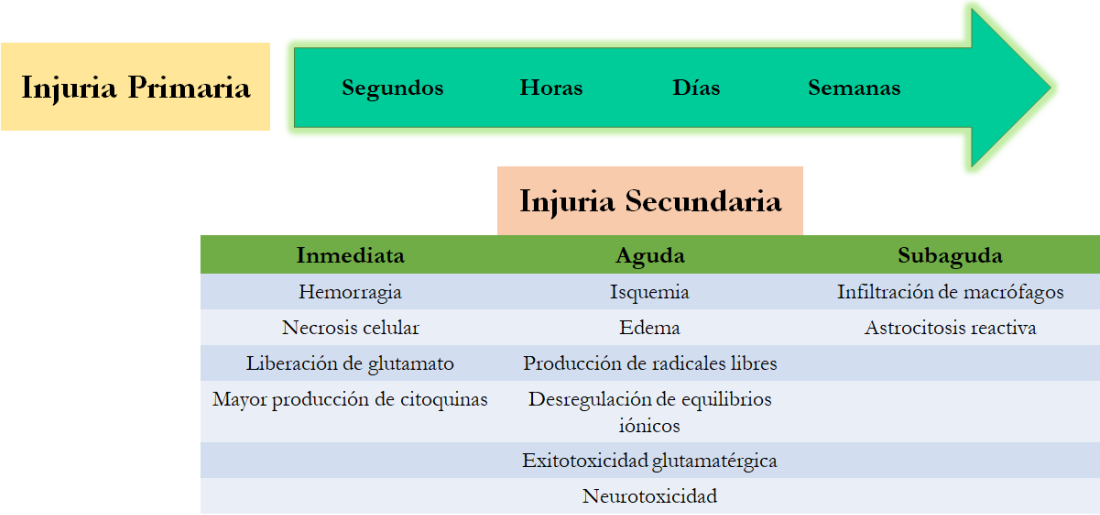


Figura 1.31. Mecanismos de injuria primaria y secundaria temprana. La injuria primaria desencadena una serie de eventos que llevan a la injuria secundaria. Modificado de Witiw & Fehlings, 2015.

Las causas más comunes de injuria aguda de la médula espinal son a causa de colisiones vehiculares, caídas, lesiones traumáticas y violencia (Witiw & Fehlings, 2015). Sobre la base de las imágenes y los hallazgos histológicos de la médula espinal lesionada, la lesión traumática se puede clasificar como una contusión que evoluciona hacia la formación de cavidades, compresión masiva o laceración (Nardone *et al.*, 2017).

1.4.1 Modelos de injuria de la médula espinal en animales de laboratorio

Si bien diversas especies animales (gato, perro, cerdo, rata, ratón y primates no humanos) son utilizados en la generación de modelos de injuria de la médula espinal, los modelos en rata son los más utilizados, fundamentalmente debido al costo, accesibilidad, facilidad de mantenimiento, y debido a la existencia de técnicas de análisis funcionales bien establecidas (Silva *et al.*, 2014).

Actualmente, los modelos de injuria de la médula espinal más utilizados en ratas incluyen la hemisección, la contusión, la transección y la resección de segmentos (Nardone *et al.*, 2017). Cada modelo ayuda a comprender diferentes cuestionamientos y, asimismo, cada uno posee ventajas y desventajas.

1.4.1.1 Transección

Estos métodos incluyen la transección completa, la mielotomía focal, la hemisección dorsal o lateral, la resección o las lesiones por aspiración. Estos procesos pueden hallarse englobados bajo el término laminectomía (Nardone *et al.*, 2017). La transección requiere de la apertura de la duramadre y del corte de parte o toda la médula espinal, mediante un instrumento afilado (Rosenzweig & McDonald, 2004; Silva *et al.*, 2014). En ciertas ocasiones, se utiliza la succión en lugar de o además del instrumento afilado. Cabe mencionar que la ablación por succión puede inducir una lesión diferente, ya que parte de la vasculatura de la médula espinal puede quedar intacta. En algunos casos, se extirpan porciones extendidas de la médula (Rosenzweig & McDonald, 2004). En ocasiones, se recurre a la hemisección lateral en lugar de la transección total, ya que la integridad y la función de uno de los lados se preservan (Silva *et al.*, 2014). Estas lesiones unilaterales de ciertas vías espinales ascendentes y descendentes es útil para estudiar déficits locomotores y sensoriales, y la posible recuperación mediante determinadas pruebas (Nardone *et al.*, 2017). Las lesiones por

transección, cuando se realizan correctamente, permiten observar demostraciones anatómicas de regeneración, ya que el experimentador controla la ubicación exacta y la extensión de la lesión (Rosenzweig & McDonald, 2004). Este modelo proporciona información valiosa en estrategias que se dirigen a la regeneración de axones y, si bien no imita las lesiones observadas generalmente en la clínica, puede ser el modelo más apropiado para la implantación de dispositivos específicos.

1.4.1.2 Contusión

Las lesiones por contusión se inducen, por lo general, golpeando la médula espinal expuesta (sin interrupción de la duramadre) mediante una pesa de baja denominación, sujeta a un dispositivo impactador; o por medio de un dispositivo impulsado por solenoide que desplaza a la médula espinal en una magnitud preseleccionada (Rosenzweig & McDonald, 2004; Silva *et al.*, 2014). Una computadora monitorea el impacto, el que es altamente reproducible. Estos dispositivos permiten la medición de eventos biomecánicos tales como el impulso, la velocidad, la potencia y la energía, lo que permite un conocimiento superior del grado de la lesión. Sin embargo, en comparación con el modelo de transección, en este modelo es más difícil distinguir entre el tejido sobrante y el regenerado (Silva *et al.*, 2014). Estos modelos brindan información complementaria sobre la reparación de la médula espinal (Rosenzweig & McDonald, 2004).

1.4.1.3 Compresión

El modelo de compresión fue introducido en 1978. La lesión se induce mediante la compresión de la médula espinal con un clip de aneurisma modificado, pinzas, o colocando una pesa sobre la médula espinal expuesta

(Rosenzweig & McDonald, 2004). Se han descrito también lesiones similares con el uso de fórceps o de un balón de compresión. En forma similar a los modelos generados por el uso de los impactadores, el modelo de compresión puede crear diferentes grados de injuria mediante el ajuste de la resistencia a la compresión, el tiempo de compresión o ambos (Silva *et al.*, 2014). Para la generación del modelo que utiliza el clip de aneurisma, se aplica una hoja del clip debajo de la superficie ventral de la médula espinal y la otra sobre la superficie dorsal. El clip se calibra para comprimir la médula espinal, ejerciendo una fuerza de compresión conocida durante un tiempo determinado. Esto permite producir lesiones focalizadas (Nardone *et al.*, 2017). Este modelo imita la neuropatología observada en injurias de médula espinal: comienza con una fase temprana de propagación de necrosis y edema hemorrágico, progresando a una fase de reparación parcial y reorganización, y terminando en una fase crónica con la formación de un quiste central, atrofia axonal y cicatriz glial. El modelo de compresión ha proporcionado valiosos conocimientos sobre la fisiopatología de las lesiones de la médula espinal (del inglés, *spinal cord injuries* - SCI) y los agentes neuroprotectores (Silva *et al.*, 2014).

1.4.1.4 Injuria de la médula espinal mediada por agentes químicos

Los modelos de excitotoxicidad en ratas implican la administración de glutamato, NMDA o kainato, a través de fibras de micro-diálisis implantadas en la médula espinal. La administración intratecal de kainato conduce, tanto a la muerte de los oligodendrocitos como a la de las neuronas. La aplicación tópica de kainato o NMDA a la médula espinal dorsal provoca muerte neuronal excitotóxica (Ikonomidou *et al.*, 1996). Las microinyecciones de kainato o de ácido quisquálico (agonista de los receptores metabotrópicos de AMPA) en la sustancia gris de la médula espinal provoca su degeneración (Hadi *et al.*, 2000; Magnuson *et al.* 1999). La excitotoxicidad en la sustancia gris espinal cervical y

a nivel de los segmentos torácicos caudales y lumbares craneales, daña selectivamente a neuronas críticas para la función de las extremidades torácicas y pelvianas, respectivamente; pero no se daña la conducción axónica de largo recorrido. El suministro intratecal de kainato en la región lumbar puede conducir a déficits locomotores de las miembros caudales ([Nardone *et al.*, 2017](#)). Varios oxidantes, tales como el anión superóxido, los radicales hidroxilo y peroxinitrito, destruyen las neuronas, bloquean la conducción de axones motores y deterioran la locomoción y la función de las extremidades caudales. La microinyección de fosfolipasa A2 (una familia de enzimas que generan precursores de mediadores inflamatorios), en la sustancia blanca ventrolateral de la médula espinal torácica de la rata, produce una hemorragia dependiente de la dosis, infiltración de células inflamatorias, desmielinización, degeneración de la materia gris y blanca y déficits en la locomoción y en la conducción de los axones motores.

La administración intraespinal de lisolecitina o L-alfa-lisofosfatidil colina (un componente principal de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas), produce degeneración de oligodendrocitos y desmielinización en modelos de rata, que son características de la SCI traumática. La muerte y desmielinización de los oligodendrocitos, mediadas químicamente, pueden producir déficits de conducción del axón motor y alterar la locomoción ([Nardone *et al.*, 2017](#)).

En nuestro laboratorio, se estableció un modelo químico para la injuria de la médula espinal, mediante la inyección intraparenquimatosa de ácido kaínico ([Nishida *et al.*, 2015](#)), a nivel del segmento cervical C5. La inyección de KA en este segmento da como resultado un daño ipsilateral de la materia gris y blanca, con déficit funcional significativo asociado. Mediante este modelo, el lado contralateral del segmento no muestra ningún daño asociado con la inyección de drogas y, tanto la actividad motora, como los reflejos sensoriales asociados al miembro torácico contralateral permanecen inalterables, lo que sugiere un

efecto local de KA. Asimismo, se observaron lesiones por delante del segmento afectado (C4) y por detrás del mismo (C6), lo que habla en virtud de la comunicación de los distintos segmentos a través de las mismas proyecciones nerviosas y el LCR que las circunda en la matriz extracelular (Nishida *et al.*, 2015).

Existe la necesidad de disponer de modelos estandarizados de SCI en animales pequeños y grandes, así como de evaluaciones cuantitativas conductuales y electrofisiológicas de sus resultados. De esta forma, los resultados de las diversas intervenciones se pueden comparar directamente y correlacionar con las alteraciones moleculares, bioquímicas e histológicas. Los modelos animales de SCI son, por lo tanto, un requisito previo necesario para la evaluación clínica de los regímenes terapéuticos adecuados (Nardone *et al.*, 2017). El uso de modelos animales es crítico para posibilitar el desarrollo de terapias experimentales que permitan reparar la médula espinal injuriada.

1.5 Anestésicos Locales

La mayoría de los anestésicos locales (AL) consisten en un grupo lipófilo, como lo es un anillo aromático, conectado a un grupo ionizable, tal como una amina terciaria, mediante un grupo éster o amida. Ya que los enlaces de tipo éster son más propensos a la hidrólisis por las esterases plasmáticas que los enlaces de tipo amida, los ésteres tienen duración de acción más corta. Se trata de bases débiles que se administran en forma de sales para aumentar su solubilidad y estabilidad; pero dentro del organismo se hallarán como el compuesto neutro o como un catión (Drasner, 2015). La proporción relativa de estas dos formas está determinada por su pKa y el pH de los fluidos corporales, de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pK_a = pH - \log [base]/[ácido conjugado]$$

Por lo tanto, el pKa puede ser un efectivo estimador de la tendencia de un compuesto a existir en sus formas cargada o neutra. Así, para un pH dado, cuanto menor sea el pKa, mayor será el porcentaje de la base débil neutra. Dado que el pKa de la mayoría de los AL se halla en el rango entre 7,5 - 9, la forma catiónica cargada constituye el mayor porcentaje, a pH fisiológico.

Los AL actúan en cualquier región del sistema nervioso y cuando se aplican localmente, en las concentraciones apropiadas, bloquean los potenciales de acción que sustentan la conducción nerviosa de todos los tipos de fibras, de manera reversible. Debido a su interacción directa con los canales de Na⁺ de compuerta de voltaje, los AL bloquean la conducción al disminuir o prevenir el incremento transitorio en la permeabilidad de las membranas excitables al Na⁺, que normalmente se produce por una despolarización leve de la membrana. En la actualidad, se acepta que el mecanismo principal de acción incluya su interacción con uno o más sitios de fijación específicos dentro del canal de Na⁺. Conforme la acción anestésica se desarrolla progresivamente en un nervio, se incrementa de manera gradual el umbral para la excitabilidad eléctrica, se reduce la velocidad de incremento del potencial de acción, se retrasa la conducción del impulso y disminuye el factor de seguridad para la conducción; todos estos factores reducen la probabilidad de propagación del potencial de acción, y finalmente inducen la falla de la conducción nerviosa ([Catterall & Mackie, 2007](#)).

El sitio en el cual actúan los AL, al menos en su forma cargada, es accesible sólo desde la superficie interior de la membrana; por lo cual, los AL aplicados de modo externo deben cruzar primero la membrana antes de poder ejercer una acción de bloqueo (**Fig. 1.32**) ([Catterall & Mackie, 2007](#); [Drasner, 2015](#)).

El mecanismo de acción primario de los AL es el bloqueo de los canales de sodio operados por voltaje. La membrana excitable de los axones nerviosos, la membrana del músculo cardíaco, y los cuerpos celulares neuronales mantienen sus potenciales transmembrana de reposo entre -90 a -60 mV (**Fig. 1.33**). Durante la excitación, los canales de Na^+ se abren, y una corriente rápida hacia el interior de la célula despolariza la membrana hacia el potencial de equilibrio del sodio (+40 mV). Como resultado de esta despolarización, los canales de sodio se cierran (se inactivan) y los canales de potasio se abren. La salida de K^+ hacia el espacio extracelular repolariza la membrana hasta el potencial de equilibrio para el K^+ (-95 mV); esta repolarización devuelve a los canales de sodio al estado de reposo, con un tiempo de recuperación característico, que determina el período refractario. Los gradientes iónicos transmembrana son mantenidos por la bomba de sodio ([Drasner, 2015](#)). El efecto de los AL sobre la corriente rectificadora de K^+ es de menor importancia, dado que se necesitan elevadas concentraciones de anestésico para bloquear esta corriente ([Bräu *et al.*, 1995](#)).

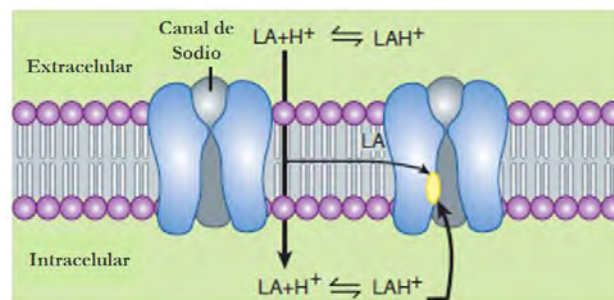


Figura 1.32. Representación esquemática de la interacción de los AL con los sitios receptores. En el espacio extracelular los AL se presentan en equilibrio entre su forma cargadas y su forma neutra. La molécula de AL cargada (catión) atraviesa en baja cuantía las membranas lipídicas; por lo tanto, el acceso al espacio intracelular se logra por medio del paso de la forma neutra a través de las membranas. Una vez en el espacio intracelular, se genera un nuevo equilibrio que da como resultado la formación de los cationes más activos. Estos cationes se unen a su receptor en el vestíbulo interior del canal de sodio. El AL también puede acceder directamente mediante la difusión lateral dentro de la membrana (vía hidrofóbica). Modificado de [Drasner, 2015](#).

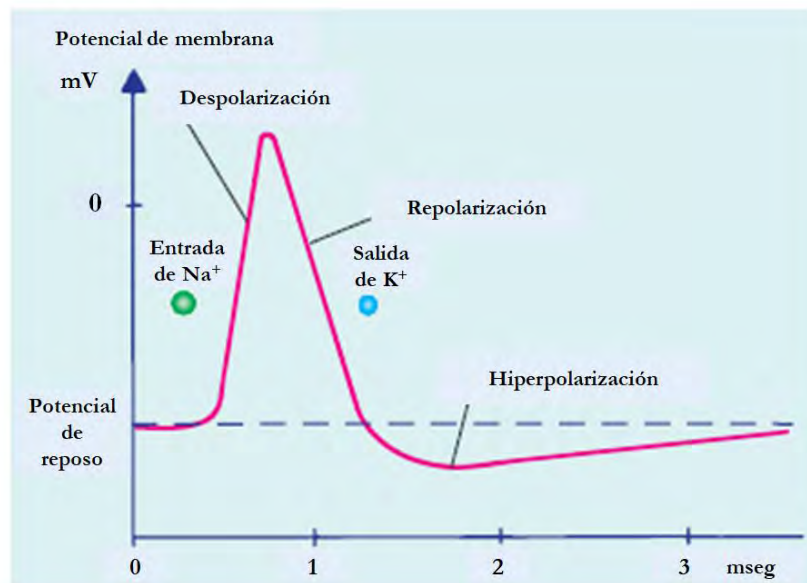


Figura 1.33. Esquema de un potencial de acción típico. Modificado de [Brodal, 2010](#).

El grado de bloqueo producido por una concentración determinada de un AL depende de la manera en que se haya estimulado al nervio, y de su potencial de membrana en reposo. Un nervio en reposo es mucho menos sensible a los AL que el que se estimula de manera repetitiva; la mayor frecuencia de la estimulación y el potencial de membrana más positivo producen un mayor grado de bloqueo anestésico. Estos efectos dependientes de la frecuencia y el voltaje se deben a que la molécula del AL, que se encuentra en su estado cargado, accede a su sitio de fijación dentro del poro sólo cuando el canal de Na^+ se halla en estado abierto, y a que el AL se fija con mayor firmeza y estabiliza el estado inactivado del canal de Na^+ (ver más adelante). Cuanto más pequeño e hidrófobo sea el AL, más rápida será la disociación ([Catterall & Mackie, 2007](#)).

Cuando se aplican concentraciones crecientes de un AL a una fibra nerviosa, el umbral de excitación aumenta, la conducción del impulso se ralentiza, la tasa de aumento del potencial de acción disminuye, la amplitud del potencial de acción disminuye y, finalmente, la capacidad de generar un potencial de acción queda

completamente abolida. Estos efectos progresivos son el resultado de la unión del AL a más y más canales de sodio. Si la corriente de sodio se bloquea en una longitud crítica del nervio, la propagación a través del área bloqueada ya no será posible. En los nervios mielinizados, la longitud crítica parece ser de dos a tres nodos de Ranvier. A la dosis mínima requerida para bloquear la propagación, el potencial de reposo no se altera significativamente (Drasner, 2015).

En general, las fibras del sistema nervioso autónomo, las fibras C no mielinizadas de pequeño calibre (que median sensaciones de dolor), y las fibras A δ mielinizadas de pequeño calibre (que median sensaciones de dolor y temperatura) quedan bloqueadas antes que las fibras A γ , A β y A α mielinizadas de mayor calibre (que median información postural, de tacto, de presión y motora) (Tabla 1.1) (Catterall & Mackie, 2007). Además de bloquear la conducción en los axones en el SNP, los AL interfieren con la función de todos los órganos en los que se produce conducción o transmisión de impulsos. Por esto, tienen efectos significativos en el SNC, los ganglios autónomos, la unión neuromuscular y todos los tipos de músculo. El impacto de estos efectos secundarios es proporcional a la concentración del AL que se alcanza en la circulación.

Tipo de fibra	Función	Diámetro (μm)	Mielinización	Velocidad de conducción (m/s)	Sensibilidad al bloqueo
Tipo A					
α	Propiocepción, motora	15 - 20	Abundante	70 - 120	+
β	Tacto, presión	5 - 12	Abundante	30 - 70	++
γ	Husos musculares	3 - 6	Abundante	15 - 30	++
δ	Dolor, temperatura	2 - 5	Abundante	5 - 25	+++
Tipo B	Autonómica preganglionar	< 3	Pobre	3 - 15	++++
Tipo C					
Raíz dorsal	Dolor	0,4 - 1,2	Ninguna	0,5 - 2,3	++++
Simpática	Posganglionar	0,3 - 1,3	Ninguna	0,7 - 2,3	++++

Tabla 1.1. Tamaño de diferentes tipos de fibras y sus respectivas susceptibilidades relativas a la acción de los anestésicos locales. Modificado de Drasner, 2015.

1.5.1. Canal de sodio regulado por voltaje

El canal de Na^+ regulado por voltaje es una proteína de membrana integral alostérica, de múltiples unidades, que selectivamente permite la difusión pasiva de los iones de Na^+ a través de ella.

Estructuralmente, la unidad funcional del canal de Na^+ regulado por voltaje es una única cadena polipeptídica dispuesta en la membrana como 24 segmentos transmembrana, formando cuatro dominios, cada uno formado por seis segmentos transmembrana. Dentro de cada dominio, se encuentra la llamada región S4, cuya secuencia de aminoácidos es altamente homóloga a la de las otras regiones S4 en el canal. La región S4 contiene varios aminoácidos cargados positivamente, que detectan cambios en el potencial de membrana y que luego reaccionan para inducir los cambios conformacionales que causan la activación. Se cree que las unidades de enlace S5-S6 dentro de cada dominio forman el camino para los iones. Cerca del extremo amino se encuentra la llamada región de bola y cadena, que puede bloquear el canal abierto para inactivarlo (**Fig. 1.34**).

El canal se conmuta entre estado abierto y cerrado por cambios en el estado de despolarización de la membrana. Estos cambios alteran la conformación de la membrana, dando como resultado cambios en la permeabilidad iónica. A potenciales de membrana más positivos ($+V_m$), el canal se hallará en el estado activado abierto. Si se mantiene el potencial positivo, el canal se inactiva en estado abierto. Los potenciales de membrana negativos ($-V_m$) dirigen la secuencia de activación en la dirección opuesta, y aumentan la probabilidad de cambio del canal, desde un estado abierto inactivado al de estado abierto activado, y luego al estado cerrado ([Greenstein & Greenstein, 2000](#)).

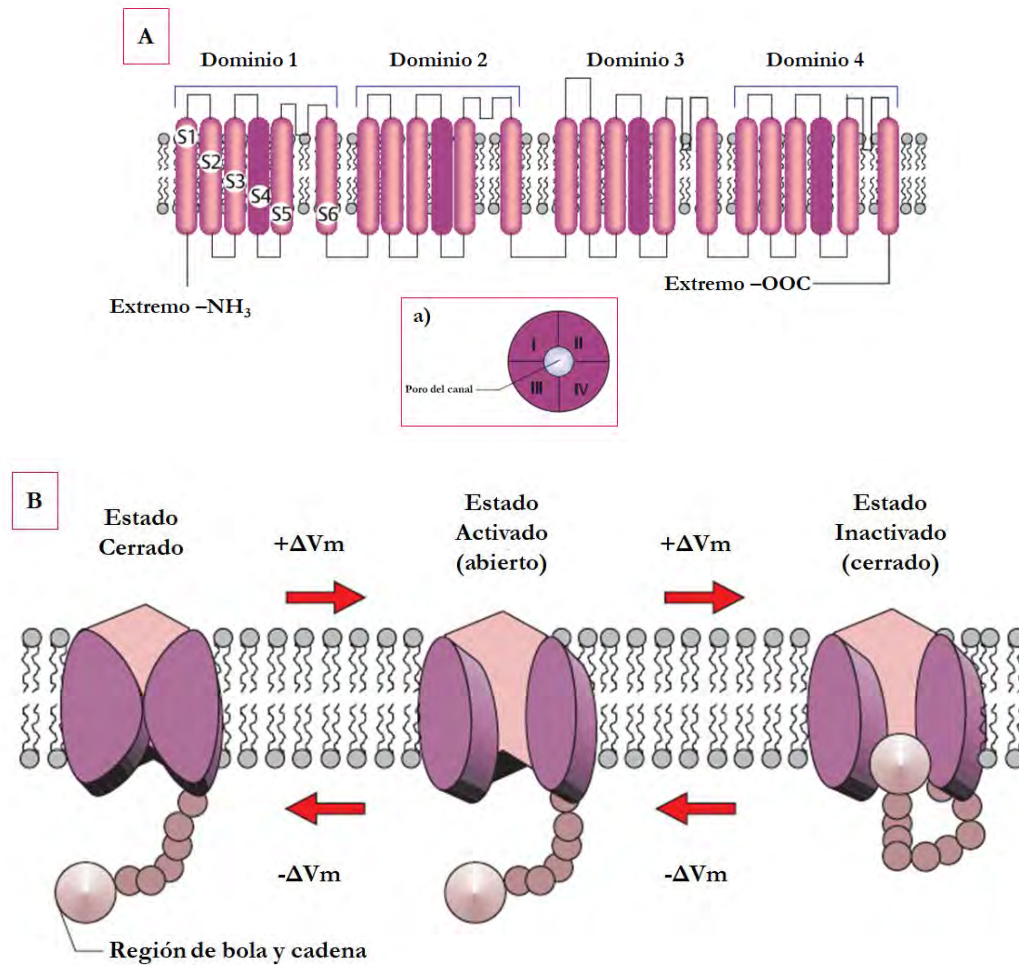


Figura 1.34. A- Representación esquemática de la estructura del canal de sodio con compuerta de voltaje. **A)** esquema de la distribución hipotética de los cuatro dominios del canal, vistos desde la cara externa de la membrana. **B-** Esquema del canal de sodio operado por voltaje y su transición entre los diferentes estados. Modificado de [Greenstein & Greenstein, 2000](#).

En mamíferos se han caracterizado nueve miembros de una familia de canales de sodio y se han clasificado como Nav1.1-Nav1.9, donde el símbolo químico (Na) representa el ion primario, el subíndice (v) denota el regulador fisiológico (en este caso, voltaje), el número inicial (1) denota el gen y el número que sigue al punto (1 a 9) indica la isoforma particular ([Drasner, 2015](#)).

1.5.2 Usos farmacológicos de los AL

Los AL pueden proveer analgesia y anestesia altamente efectivas en regiones bien definidas. Las rutas habituales de administración incluyen la aplicación tópica (por ejemplo, en la mucosa nasal o sobre heridas), la inyección en las proximidades de terminaciones nerviosas periféricas (infiltración perineural) y troncos nerviosos principales, e inyección en los espacios epidurales o subaracnoideos que rodean la médula espinal (**Fig. 1.35**). La inyección de los AL en el espacio extradural, se conoce como bloqueo epidural. Un bloqueo caudal es un tipo específico de bloqueo epidural, en el que se inserta una aguja en el canal caudal a través del hiato sacro. Las inyecciones alrededor de los nervios periféricos se conocen como bloqueos perineurales (por ejemplo, bloqueo paravertebral). Finalmente, la inyección en el LCR del espacio subaracnoideo (intratecal) se conoce como bloqueo espinal.

1.5.2.1 Efectos en el sistema cardiovascular

Después de su absorción por vía general, los AL y la lidocaína en particular, actúan en el aparato cardiovascular. El sitio primario de acción es el miocardio, donde disminuyen la excitabilidad eléctrica, la frecuencia de conducción y la fuerza de contracción. Las propiedades antiarrítmicas de la lidocaína se atribuyen a su acción directa en la membrana neuronal para incrementar el umbral de estimulación eléctrica en el ventrículo durante la diástole. La permeabilidad de la membrana al ion Na^+ disminuye, lo cual conduce a inhibición de la despolarización y finalmente resulta en bloqueo de la conducción ([Turner & Perry, 2017](#)). Estos efectos cardiovasculares adversos suelen observarse sólo después de que se alcanzan concentraciones generales altas y se producen efectos en el SNC ([Catterall & Mackie, 2007](#)).

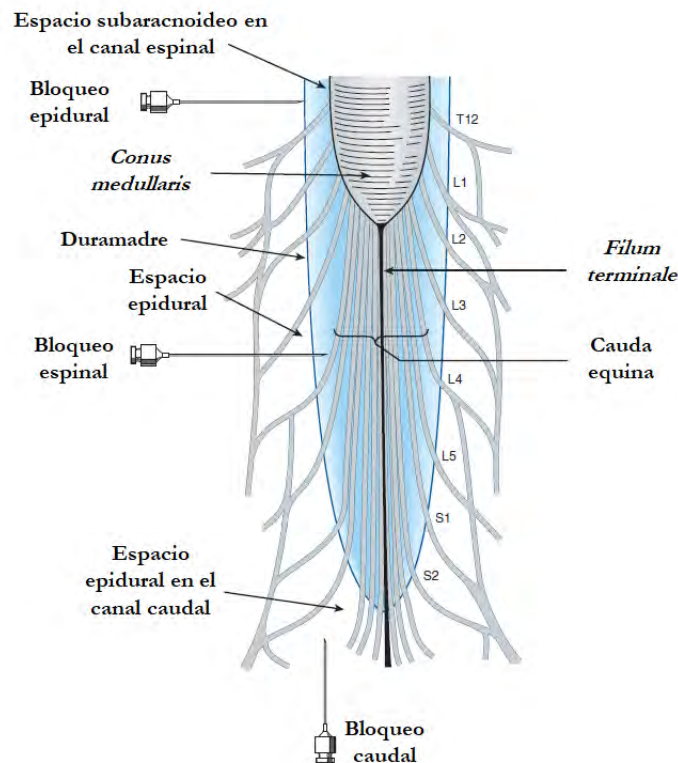


Figura 1.35. Diagrama esquemático de los sitios típicos de inyección de anestésicos locales en, y alrededor del canal espinal. Modificado de [Drasner, 2015](#).

1.5.2.2 Efectos en el SNC

Particularmente en el SNC, los AL pueden producir estimulación con inquietud y temblor, que pueden llegar hasta convulsiones clónicas. La estimulación central va seguida de depresión y suele sobrevenir la muerte por insuficiencia respiratoria ([Catterall & Mackie, 2007](#)).

1.5.2.3 Efectos en el músculo liso

Los AL deprimen las contracciones en el intestino intacto y en tiras de intestino aislado. Relajan también el músculo liso vascular y bronquial, aunque las concentraciones bajas pueden producir inicialmente su contracción. Las anestesia raquídea y epidural, lo mismo que la instilación de AL en la cavidad peritoneal, originan parálisis del sistema nervioso simpático, que puede dar por

resultado un aumento del tono de la musculatura gastrointestinal (Catterall & Mackie, 2007).

1.5.3 Lidocaína

La lidocaína ($C_{14}H_{22}N_2O$; 2-Dietilamino-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida; PM: 234,34) un AL conocido comercialmente en nuestro país como Xylocaína®, es una aminoetilamida. Es el prototipo de anestésico local amídico (Fig. 1.36).

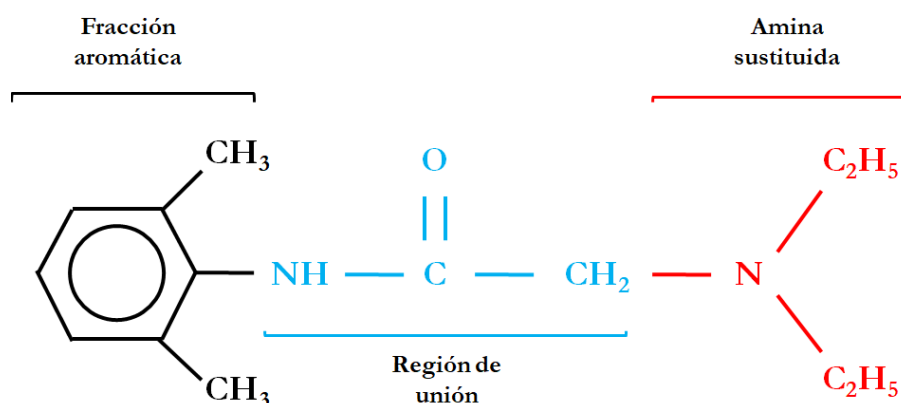


Figura 1.36. Fórmula estructural de la lidocaína, una aminoetilamida. Está compuesta por una fracción hidrófoba (aromática) (en negro), una región intermedia o de unión (en celeste) y una región hidrófila (amina sustituida) (en rojo).

Se absorbe rápidamente luego de su administración parenteral y desde el tubo digestivo y vías respiratorias. Tiene una gran amplitud de aplicaciones clínicas como AL de duración intermedia, tanto en medicina veterinaria como humana, siendo utilizado también como antiarrítmico (Catterall & Mackie, 2007).

1.5.3.1 Lidocaína como antiepiléptico

La lidocaína puede ejercer un importante papel en el tratamiento de las convulsiones neonatales, donde las neuronas y las conexiones neuronales aún

están en desarrollo, con un perfil de seguridad aceptable. El mecanismo exacto por el cual la lidocaína ejerce efectos antiepilépticos es desconocido, pero probablemente se deba, en parte, al bloqueo del canal de sodio que conduce a la reducción en la propagación de las señales neuronales. Los efectos y las toxicidades dependerán de la dosis/concentraciones y serán afectados por la producción activa de metabolitos. Las dosis/concentraciones utilizadas en infusión están en el rango de 0,5 a 0,8 mg/Kg/h. En mayores concentraciones, la lidocaína puede actuar como un proconvulsivo, en parte, debido al efecto aditivo de sus metabolitos activos. Sus efectos antiepilépticos están reforzados por sus propiedades de amina lipófila, que le permiten cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica y ser más fácilmente disponible en el sitio de acción (Turner & Perry, 2017).

1.5.3.2 Tratamiento del dolor

El dolor es una complicación frecuente de las SCI. El dolor relacionado con SCI se clasifica como dolor causado por la activación de nociceptores, que son neuronas sensoriales primarias para el dolor (nociceptivo), o dolor causado por daño al sistema sensorial en sí (neuropático). El dolor nociceptivo puede originarse en la piel o en el sistema musculoesquelético u órganos viscerales, mientras que el dolor neuropático puede involucrar al sistema nervioso periférico o, en el caso de una lesión de la médula espinal, al sistema nervioso central. Estudios de prevalencia indican que dos tercios de los individuos afectados por lesiones medulares informan de algún tipo de dolor y casi un tercio de estos individuos califican su dolor como severo. El dolor se considera un factor importante en la reducción de la calidad de vida, habiéndose demostrado que afecta negativamente variadas funciones, tales como el sueño, en los individuos afectados con SCI. Asimismo, se ha observado que individuos afectados con SCI cervical o lumbosacra se hallan dispuestos a sacrificar sus

plenas funciones sexuales, intestinales o de la vejiga, con el único propósito de aliviar su dolor (Teasell *et al.*, 2011).

El procesamiento nociceptivo activa en el cerebro la “matriz del dolor”, que involucra a estructuras tales como las cortezas somatosensorial, insular, cingulada y prefrontal, y el tálamo. La administración local de lidocaína 2 % inhibe esta activación de la matriz del dolor en el SNC (Bosshard *et al.*, 2012).

Para el manejo del dolor, los AL se inyectan tópicamente (por ejemplo, aplicación intra-articular) o a través de catéteres perineurales o de heridas. Las concentraciones de AL usadas clínicamente varían entre 2 mg/ml y 10 mg/ml, dependiendo del tipo elegido y la duración de la analgesia (Fedder *et al.*, 2010).

Tobe y col. (2010) produjeron unas láminas de lidocaína de liberación lenta que utilizaron para el bloqueo del nervio ciático en un modelo de dolor posoperatorio en ratas. El tratamiento con esta formulación de lidocaína de liberación controlada produjo efectos de anti-hipersensibilidad por hasta una semana, sin detectar ningún proceso inflamatorio del nervio ciático.

También se ha mostrado que la lidocaína disminuye la frecuencia y la estabilidad de la activación neuronal involucrada en el procesamiento del dolor nociceptivo, aunque aún no está caracterizado en detalle cuál es el mecanismo por el cual afecta la excitabilidad de las neuronas sensoriales centrales (Olschewski *et al.*, 2009).

1.5.3.3 Signos neurológicos transitorios

Desde la introducción temprana de la anestesia espinal en la práctica clínica, los informes esporádicos de lesiones neurológicas asociadas con esta técnica generaron la preocupación de que los agentes AL fueran potencialmente neurotóxicos (Drasner, 2015).

Complicaciones como síntomas neurológicos transitorios y síndrome de la cola de caballo se han descrito después de la anestesia espinal y se cree que se deben

a la neurotoxicidad de la anestesia local. La incidencia de síntomas neurológicos transitorios es mayor cuando se usa lidocaína, en comparación con otros AL, tales como bupivacaína, prilocaína, cloroprocaína y ropivacaína (Doan *et al.*, 2014).

El mecanismo exacto de la neurotoxicidad de los AL aún no ha sido elucidado. Sin embargo, se ha comprobado que esta acción no está mediada por el bloqueo de los canales de sodio operados por voltaje. Los AL pueden producir necrosis y apoptosis a través de mecanismos que incluyen el incremento del calcio intracelular, la liberación del citocromo c mitocondrial, y la inhibición de la respiración mitocondrial (Doan *et al.*, 2014). No sólo bloquean los canales de Na^+ , sino que también bloquean los canales de Ca^{+2} , a mayores concentraciones. A concentraciones cercanas a los niveles plasmáticos terapéuticos, pero mucho más bajas que la concentración en LCR durante la anestesia espinal, limitan el aumento citosólico de Ca^{+2} . Un mecanismo propuesto como responsable de sus acciones tóxicas es la elevación prolongada de $\text{Ca}^{+2}_{\text{cit}}$, en contraste con su elevación fugaz, que se produce durante la respuesta fisiológica a los neurotransmisores (Johnson *et al.*, 2002).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han documentado la ocurrencia de neurotoxicidad espinal a causa de la aplicación de AL y de lidocaína en particular, acción que depende de la concentración aplicada y del tiempo de exposición (Doan *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2002; Kamiya *et al.*, 2005; Liu & McDonald., 2001; Malet *et al.*, 2015). Se ha observado que causan muerte por apoptosis y que a mayores concentraciones ocasionan muerte por necrosis. Asimismo, la toxicidad de los AL se correlaciona con su coeficiente de partición octanol/agua y con su potencia clínica relativa (Werdehausen *et al.*, 2009).

La administración intratecal de lidocaína elevó la liberación de glutamato en el LCR, de manera dependiente y proporcional a la concentración aplicada para lidocaína 2,5 %, 5 % y 10 %. Las latencias en la prueba de sensibilidad al calor

(*tail flick test*) se prolongaron significativamente hasta por 4 días después de la inyección y estos efectos también fueron dependientes de la concentración (Cherng *et al.*, 2011).

1.5.3.4 Efectos sobre la curación de heridas

Otros estudios también han demostrado los efectos tóxicos de los AL en los tejidos que están implicados en la recuperación posoperatoria y la curación de heridas (Bisla & Tanelian, 1992; Fedder *et al.*, 2010). Los eventos que ocurren en el proceso de curación de heridas pueden ser debidos a que la lidocaína ejerce efectos citotóxicos sobre poblaciones de fibroblastos y que dichos efectos se relacionan de modo proporcional con la concentración utilizada y el tiempo de exposición (Fedder *et al.*, 2010). Otros investigadores, por su parte, observaron una estimulación de la proliferación de fibroblastos gingivales humanos, dependiente de la dosis de lidocaína utilizada, determinado mediante recuento celular y medición de proteínas totales (Quinteros Villarruel *et al.*, 2014). Por otro lado, Bisla y Tanelian (1992) examinaron el efecto tisular de diferentes concentraciones de lidocaína y observaron un impedimento de la regeneración epitelial, dependiente de la concentración del anestésico utilizado.

1.5.3.5 Efectos sobre la proliferación y supervivencia de diferentes poblaciones celulares

Diversos estudios han puesto de manifiesto efectos positivos derivados de tratamientos con lidocaína, tanto *in vitro* como *in vivo*. La lidocaína protegió a poblaciones de eritrocitos de origen humano, probablemente debido a sus propiedades antioxidantes (Lenfant *et al.*, 2004). En otro estudio, la proliferación de osteoblastos se vio favorecida por la incubación con dosis bajas de lidocaína, al tiempo que se incrementó la producción de matriz ósea por parte de estos, y la expresión de osteocalcina, un regulador en la cascada de

señales de la producción de hueso, siendo todos estos efectos dependientes de la dosis utilizada (Pentyala *et al.*, 2012).

En estudios *in vivo*, se observó una reducción significativa de la necrosis del tejido, luego de la infección sistémica con el virus aftoso, todo lo cual resultó ser dependiente de la concentración y la frecuencia de administración de lidocaína (Portiansky & González, 1995); asimismo, se observó un marcado aumento de la proliferación celular endotelial y de la densidad capilar, que condujo a la formación de capilares nuevos, luego del tratamiento con lidocaína sobre el músculo esquelético de rata (Jejurikar *et al.*, 1997). También, confirió un efecto protector en ratones, frente a la peritonitis séptica, atenuando la respuesta inflamatoria hiperaguda, lo que resultó en un descenso de la mortalidad y menor progresión de disfunción aguda de hígado y riñón (Gallos *et al.*, 2004); más aún, mostró ser altamente efectiva en el tratamiento de la gastroenteritis hemorrágica aguda producida por la infección con parvovirus canino, logrando que la morbilidad se redujera drásticamente y la mortalidad fuese abolida. Los hallazgos morfológicos indicaron que la necrosis fue detenida y se observó recuperación del epitelio, mientras que la respuesta inmunitaria no se vio alterada, ya que se hallaron títulos altos de anticuerpos específicos (Mahiques *et al.* 2000). La inducción de isquemia de miocardio en un modelo porcino demostró que la lidocaína, tanto administrada en forma intravenosa como perfundida de manera retrógrada, antes de la reperfusión, preservó el miocardio isquémico y redujo el área de infarto luego de la reperfusión (Lee *et al.*, 1998).

Un estudio *in vitro* demostró que la lidocaína, a las concentraciones utilizadas para ejercer su efecto de AL, promovía la apoptosis de fibroblastos gingivales humanos. El mecanismo de acción involucra la estimulación de la proteína quinasa A (PKA) y la inhibición de la proteína quinasa C (PKC), lo cual estimula a la caspasa-3 y conduce a la muerte celular programada (Quinteros Villaruel *et*

al., 2011). En un estudio posterior, los autores demostraron que los efectos de la lidocaína sobre esta población celular dependían de la concentración utilizada ya que, a concentraciones menores a la utilizada en el primer estudio, la lidocaína activaba la actividad de la PKC, induciendo un incremento de la síntesis de ADN bajo la regulación de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Quinteros Villaruel *et al.*, 2014).

1.5.3.6 Efectos antiinflamatorios

La lidocaína ejerce efectos sobre las células inflamatorias, especialmente sobre los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), pero también sobre macrófagos y monocitos. Dado que los PMNs no expresan canales de Na^+ , los efectos de la lidocaína sobre estas células no pueden ser justificados por el bloqueo de éstos (Hollman & Durieux, 2000). Los AL también son capaces de inhibir la liberación de leucotrieno B_4 , un potente agente quimiotáctico y estimulador de la actividad de los PMNs. La incubación *in vitro* de PMNs y monocitos con 2-20 mM de lidocaína inhibió la liberación de leucotrieno B_4 casi completamente (Sinclair *et al.* 1993).

La lidocaína puede actuar directamente sobre la microglía; inhibiendo el incremento de Ca^{+2} intracelular, atenúa la producción de citoquinas proinflamatorias (tales como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6) en cultivos de microglía de rata expuestos a ATP extracelular (Su *et al.*, 2010).

En un estudio *in vivo*, la aplicación de lidocaína redundó en una reducción de la infiltración aguda de leucocitos PMNs en el páncreas de ratón, luego de la infección con el virus aftoso (Portiansky & González, 1995). En un estudio más reciente, el tratamiento con lidocaína redujo la producción de citoquinas inflamatorias en cerebros de rata sometidos a injuria con KA (Chiu *et al.*, 2016).

Es de particular relevancia, el hecho de que las concentraciones de AL requeridas para la verificación de los efectos antiinflamatorios *in vitro* sean mayores a las requeridas *in vivo* (Hollman & Durieux, 2000).

1.5.3.7 Efectos neuroprotectores

La protección cerebral se puede definir como la "prevención o mejora del daño neuronal evidenciado a causa de anormalidades en el metabolismo cerebral, la histopatología o la función neurológica que ocurren después de un evento hipóxico o isquémico". Las terapias de protección cerebral incluyen terapias dirigidas a la prevención de la patología cerebral isquémica y a la reanimación de tejido que ya ha sufrido daño isquémico (Hall & Murdoch, 1990).

La lidocaína puede conferir protección cerebral mediante la modulación de mediadores inflamatorios, la preservación del flujo sanguíneo cerebral, la reducción del metabolismo cerebral y la desaceleración de los flujos de iones isquémicos. La protección cerebral mediante lidocaína se demostró, inicialmente, en un modelo felino de embolia gaseosa arterial cerebral. Gran parte de los experimentos neuroprotectores *in vivo* iniciales evaluaron la lidocaína como un tratamiento para la enfermedad por descompresión. En 1999, Mitchel *et al.* informaron un déficit neurocognitivo significativamente menor en 55 pacientes con cirugía de válvula que fueron tratados con lidocaína. Por otra parte, un modelo en gato mostró que el tratamiento previo de los animales con lidocaína atenuaba, en gran medida, el aumento de la hipertensión intracraneal causada por la embolia aérea (Hall & Murdoch, 1990). Wang y col. (2002) estudiaron los efectos de la lidocaína sobre la incidencia de la disfunción cognitiva en el período postoperatorio temprano luego de la cirugía cardíaca, en un ensayo clínico. Sus resultados mostraron que la proporción de pacientes que exhibieron disfunción cognitiva postoperatoria se redujo, significativamente, en el grupo que recibió lidocaína, en comparación con el grupo que recibió placebo; y concluyeron que la administración intraoperatoria de lidocaína

reduce la ocurrencia de disfunción cognitiva temprana, luego de la cirugía por *bypass* de la arteria coronaria.

Una dosis antiarrítmica de lidocaína administrada antes y durante una isquemia cerebral focal transitoria en ratas, redujo el tamaño del área de infarto y mejoró la recuperación neurológica (Lei *et al.*, 2001). La administración intravenosa de dosis antiarrítmicas de lidocaína (2-4 mg/kg) mejoró la supervivencia de poblaciones neuronales del hipocampo y preservó la función cognitiva, en un modelo de isquemia cerebral global y transitoria en ratas, cuando se aplicó antes, durante y después de la injuria (Popp *et al.*, 2011). La lidocaína inyectada por vía subcutánea antes, durante y después de una isquemia cerebral global, redujo significativamente el número de neuronas isquémicas en la región CA1 del hipocampo, comparada con el grupo control (Goyagi *et al.*, 2009). En este estudio, la aplicación de lidocaína no redujo la concentración de glutamato en la región CA1 del hipocampo durante la isquemia; lo cual sí se observó cuando la aplicación de la lidocaína fue realizada en forma intravenosa (Terada *et al.*, 1999).

La administración sistémica de lidocaína (0,8 o 4 mg/Kg; ip), 30 minutos antes de una inyección de KA (15 mg/Kg), ejerció efectos anticonvulsivos y neuroprotectores en un modelo de injuria hipocampal, reduciendo significativamente la muerte neuronal en la región CA3 del hipocampo (Chiu *et al.*, 2016).

La lidocaína también mostró efectos protectores sobre cultivos celulares neocorticales de rata, que fueron sometidos a privación de oxígeno y glucosa (Probert *et al.*, 1997). Sus resultados sugirieron que la neuroprotección ejercida por los moduladores de los canales de Na⁺ está mediada por la inhibición de la liberación de glutamato más que por efectos pos-sinápticos. Otro estudio utilizó cortes hipocampales de rata expuestos *in vitro* durante tiempos breves a un medio que simuló las condiciones de isquemia. El pretratamiento de los cortes

con lidocaína se manifestó en una significativa neuroprotección, tanto frente al daño de la función sináptica como frente al daño celular (Lucas *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1995; Weber & Taylor, 1994).

En un estudio *in vitro*, el tratamiento profiláctico con lidocaína inhibió la liberación de mediadores inflamatorios producidos por la microglía, a raíz de la inducción con lipopolisacárido, efectos que se postula se hallan relacionados con el bloqueo de vías de señalización específicas (Yuan *et al.*, 2014).

La administración intravenosa de lidocaína se estudió también sobre la recuperación neurológica en gatos, aplicada 15 min después de una SCI aguda experimental. Los animales tratados con lidocaína exhibieron leve o moderada hemorragia, en contraposición a la hemorragia severa exhibida por los animales no tratados. Asimismo, la reaparición de la respuesta somatosensorial evocada se observó en casi la totalidad de los animales tratados, mientras que fue nula en el grupo no tratado (Kobrine *et al.*, 1984).

Concentraciones antiarrítmicas de lidocaína inhibieron la liberación de glutamato desde las terminales nerviosas cerebrocorticales *in vitro*, mediante la reducción del flujo de Ca^{+2} . Esa inhibición parecería depender, al menos en parte, de la supresión de la actividad de las vías de las PKC y PKA. Este comportamiento demostraría que la infusión sistémica de bajas concentraciones de lidocaína tendría propiedades neuroprotectoras (Lin *et al.*, 2013).

1.6 HIPÓTESIS

En base a todo lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta el aumento en la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas, la accesibilidad a la reproducción sistematizada de estas enfermedades en animales de laboratorio, así como también la escasa información acerca de los cambios degenerativos generados a nivel de la médula y, acerca de la capacidad de esta para regenerarse, se propuso la realización del presente plan de tesis, con la siguiente hipótesis:

La inyección intraparenquimatosa de lidocaína en la médula espinal de ratas sanas, resulta en un efecto neurotóxico o en un estímulo de la proliferación celular, dependiente de su concentración; mientras que su inoculación en ratas expuestas a un agente excitotóxico, ejerce un efecto protector y/o estimulante de las poblaciones celulares.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos causados por la inyección intraparenquimatosa de lidocaína, sobre las poblaciones celulares de la médula espinal de rata, en condiciones fisiológicas, así también como bajo condiciones patológicas inducidas por la inyección de un agente neurotóxico.

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los cambios producidos sobre las diferentes poblaciones celulares de médula espinal de rata luego de inyección con lidocaína, mediante el empleo de técnicas histológicas y análisis morfométrico.
- Determinar los cambios producidos sobre las diferentes poblaciones celulares de médula espinal de rata luego de la inyección de lidocaína en forma simultánea o posterior a la inyección del KA, como agente neurotóxico, mediante el empleo de técnicas histológicas y análisis morfométrico.
- Realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de los datos obtenidos, en función de las concentraciones aplicadas y los tiempos de duración del estudio.
- Correlacionar los cambios observados sobre las diferentes poblaciones celulares, bajo las condiciones experimentales determinadas, con los signos recabados de la observación y durante el desarrollo de las pruebas comportamentales.

Materiales y Métodos

“Cuantas más cosas se saben más quedan por aprender, la ayuda que da el saber termina en lo que se ignora, si hasta la luz de la aurora termina al anochecer”.

José Larralde.
Músico y cantautor argentino.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Todos los procedimientos que involucraron animales de laboratorio fueron previamente aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, contemplando las normativas nacionales e internacionales, y según consta bajo el código de registro: 45-1-14 T/2014.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague Dawley, de entre 3 y 5 meses de edad y 350 g de peso promedio; provistos por los siguientes bioterios autorizados:

- Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires,
- Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Buenos Aires,
- Bioterio del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), con sede en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Los animales fueron alojados en una habitación destinada a tal fin, con ventilación y temperatura controlada (23 ± 2 °C). Se dispusieron en cajas de policarbonato autoclavables, de 47 cm x 29 cm x 19 cm, con tapa de acero inoxidable, y viruta irradiada. La densidad máxima permitida fue de 3 animales por caja. Todos los animales fueron sometidos a un régimen de luz/oscuridad de 12h/12h, controlado mediante un temporizador eléctrico. Los animales

tuvieron a su disposición alimento balanceado extrusado y agua acidificada (pH=2,5) *ad libitum*. La rutina de limpieza consistió en cambio de cama, cloración de las cajas y recambio del agua de bebida cada 48 h. Los animales contaron con supervisión diaria de un Médico Veterinario perteneciente al laboratorio.

2.2 Soluciones utilizadas

Las soluciones utilizadas durante los diferentes procedimientos fueron las siguientes:

Ácido kaínico (KA) 1 mM (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). El KA fue utilizado a la concentración de 1 mM, en base a los experimentos previamente realizados en nuestro laboratorio para el desarrollo de un modelo de neurodegeneración ([Nishida, 2014a](#); [Nishida et al., 2014c](#)).

Lidocaína 2% (Xylocaina[®] 2 %, AstraZeneca, Haedo, Buenos Aires, Argentina). Cloruro de sodio 0,9 % (Solución fisiológica Drawer[®], Laboratorio Drawer S.A., Quilmes, Buenos Aires, Argentina).

Ketamina, clorhidrato (Ketonal 50[®] (50mg/ml), Laboratorio Richmond División Veterinaria S.A., Grand Bourg, Buenos Aires, Argentina).

Xilacina, clorhidrato (Xylazina 10 % (100 mg/ml), PRO-SER S.A., Cap. Sarmiento, Buenos Aires, Argentina).

Todas las diluciones requeridas se llevaron a cabo utilizando cloruro de sodio 0,9 % (Solución fisiológica Drawer[®]) como diluyente.

2.3 Diseño experimental y esquema de inoculación de los animales

El diseño experimental fue estructurado en 3 etapas. Los animales utilizados en cada una de dichas etapas fueron alojados en nuestro laboratorio durante 15 días, bajo las condiciones descritas previamente. Una vez concluido este proceso de aclimatación, se dio comienzo a los procedimientos experimentales.

Durante la primera etapa, el objetivo fue analizar los efectos causados por la inyección intraparenquimatosa de la lidocaína en diferentes concentraciones, con el fin de identificar aquella concentración que causara mínimas alteraciones y/o daño a nivel de la médula espinal. Para ello, los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales (L05, L1 y L2; n=25 para cada grupo) y dos grupos control (*sham* y control; n=15 y n=6 respectivamente) (**Tabla 2.1**). Al día 0, todos los animales fueron sometidos a un conjunto de pruebas de comportamiento, que permitieron establecer el estado basal para sus funciones motoras y sensitivas. Posteriormente, los animales de los grupos experimentales y *sham*, recibieron la inyección intraparenquimatosa, dentro del segmento C5 de la médula espinal, de la solución que le fue previamente asignada (**Fig. 2.1**).

En los días 1, 2 y 3 post-inyección (pi), así como también en los días 7 y 14 pi, tanto los animales de los grupos experimentales como los animales de los grupos control, cumplieron con las pruebas comportamentales propuestas. Asimismo, en cada uno de esos días pi se llevó a cabo la eutanasia de 5 animales de cada grupo inyectado con lidocaína y de 3 animales del grupo *sham*. En el grupo control, se practicó la eutanasia de 3 animales al día 0 y de los 3 restantes, al día 14, luego de haber realizado las pruebas comportamentales correspondientes. Las diferentes concentraciones de lidocaína utilizadas en esta etapa se seleccionaron tomando como punto de partida la concentración

disponible en forma comercial y de amplia utilización en la práctica veterinaria (2 %), y a partir de ella se realizaron las correspondientes diluciones seriadas (1 % y 0,5 %).

Grupo	n	Solución	Concentración	Eutanasia (días pi)
L05 ^a	5	Lidocaína	0,5 %	1
L05	5	Lidocaína	0,5 %	2
L05	5	Lidocaína	0,5 %	3
L05	5	Lidocaína	0,5 %	7
L05	5	Lidocaína	0,5 %	14
L1 ^a	5	Lidocaína	1 %	1
L1	5	Lidocaína	1 %	2
L1	5	Lidocaína	1 %	3
L1	5	Lidocaína	1 %	7
L1	5	Lidocaína	1 %	14
L2 ^a	5	Lidocaína	2 %	1
L2	5	Lidocaína	2 %	2
L2	5	Lidocaína	2 %	3
L2	5	Lidocaína	2 %	7
L2	5	Lidocaína	2 %	14
<i>Sham</i> ^b	3	Cloruro de sodio	0,9 %	1
<i>Sham</i>	3	Cloruro de sodio	0,9 %	2
<i>Sham</i>	3	Cloruro de sodio	0,9 %	3
<i>Sham</i>	3	Cloruro de sodio	0,9 %	7
<i>Sham</i>	3	Cloruro de sodio	0,9 %	14
Control ^b	3	-	-	0
Control	3	-	-	14

Tabla 2.1. Grupos y soluciones inyectadas durante la etapa 1. ^aGrupo experimental; ^b Grupo control

Para la segunda etapa, el objetivo propuesto fue estudiar los efectos de la inyección intraparenquimatosa simultánea de lidocaína y KA. Para ello, los animales fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos experimentales: uno de ellos recibió la inyección de lidocaína (a la concentración seleccionada en base a los resultados de la primera etapa) y 1 mM KA dentro del segmento C5 de la médula espinal, mientras que el otro grupo recibió, solamente, la inyección de 1 mM KA. Al igual que en la primera etapa, al día 0, todos los animales fueron sometidos al conjunto de pruebas de comportamiento y seguidamente, cada animal recibió la inyección intraparenquimatosa de la solución que le fue previamente asignada (**Tabla 2.2**). En los días 1, 2 y 3 pi, así como también en los días 7 y 14 pi, todos los animales se sometieron a las pruebas comportamentales propuestas, como paso previo a la eutanasia de 5 animales de cada grupo (**Fig. 2.1**).

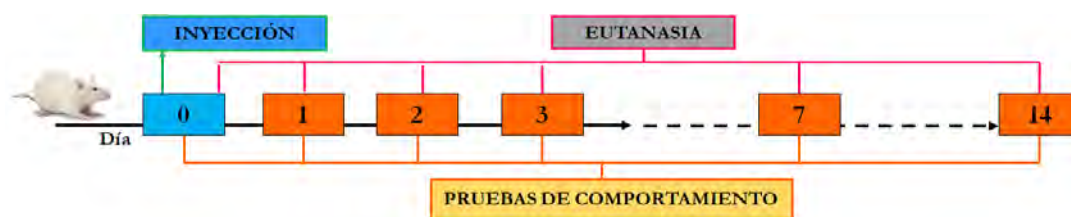


Figura 2.1. Diseño experimental planteado para las etapas 1 y 2. El día 0 se define como aquel en el cual se realiza la inyección intraparenquimatosa dentro de la médula espinal. La flecha negra continua indica los días pi consecutivos, mientras que la flecha negra segmentada indica los días pi no consecutivos.

Un tercer grupo de animales fue inyectado con la concentración de lidocaína inmediatamente superior a la seleccionada y KA 1 mM, a fin de evaluar si los efectos del anestésico se relacionaban con la concentración aplicada. En este caso, al día 0, los animales fueron sometidos al conjunto de pruebas de comportamiento y seguidamente, cada animal recibió la inyección intraparenquimatosa. En los días 7 y 14 pi, los animales se sometieron a las

pruebas comportamentales propuestas, como paso previo a la eutanasia de 3 animales.

Grupo	n	Solución	Concentración	Eutanasia (días pi)
KA1L05	5	KA; lidocaína	1 mM; 0,5 %	1
KA1L05	5	KA; lidocaína	1 mM; 0,5 %	2
KA1L05	5	KA; lidocaína	1 mM; 0,5 %	3
KA1L05	5	KA; lidocaína	1 mM; 0,5 %	7
KA1L05	5	KA; lidocaína	1 mM; 0,5 %	14
KA1L1	3	KA; lidocaína	1 mM; 1 %	7
KA1L1	3	KA; lidocaína	1 mM; 1 %	14
KA1	5	KA	1 mM	1
KA1	5	KA	1 mM	2
KA1	5	KA	1 mM	3
KA1	5	KA	1 mM	7
KA1	5	KA	1 mM	14

Tabla 2.2. Grupos experimentales y soluciones inyectadas durante la etapa 2.

En la tercera y última etapa, el objetivo propuesto fue el estudio de los efectos de la administración de una única dosis de lidocaína, posterior a la inyección del KA. Siguiendo el mismo esquema experimental presentado en la **Fig. 2.1**, todos los animales recibieron una inyección intraparenquimatosa de 1mM KA en el segmento C5 de la médula espinal al día 0. Para esta serie de experimentos, los animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos experimentales y al día 3 pi, tras cumplimentar las pruebas de comportamiento, se les administró una inyección de lidocaína (grupo tratado) o de cloruro de sodio 0,9 % (grupo *sham-K4*) en la Cisterna Magna (**Tabla 2.3**). En los días 4, 5, 6 y 7 pi, así como también en el día 14 pi (en relación al día 0, en el que fue inyectado el KA), todos los animales se sometieron a las pruebas comportamentales propuestas. La eutanasia de 5 animales por cada grupo se practicó en los días 7 y 14 pi (**Fig. 2.2**).

Grupo	n	Solución	Concentración	Eutanasia (días pi)
Sham-KA	5	KA ^a	1 mM	7
		Cloruro de sodio ^b	0,9 %	
Sham-KA	5	KA ^a	1 mM	14
		Cloruro de sodio ^b	0,9 %	
Tratado	5	KA ^a	1 mM	7
		Lidocaína ^b	0,5 %	
Tratado	5	KA ^a	1 mM	14
		Lidocaína ^b	0,5 %	

Tabla 2.3. Grupos experimentales y soluciones inyectadas durante la etapa 3.

^aAdministración intraparenquimatoso dentro del segmento C5 de la médula espinal.

^bAdministración en la Cisterna Magna del cuarto ventrículo.

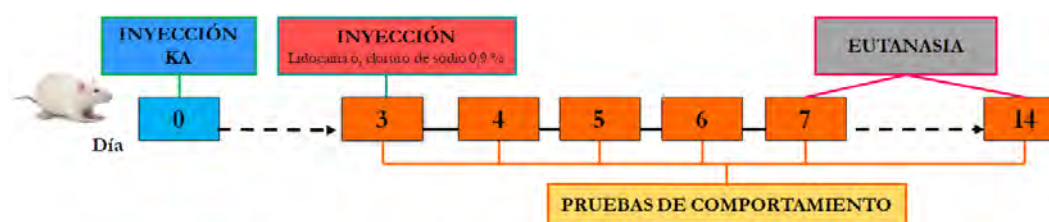


Figura 2.2. Diseño experimental planteado para la etapa 3. La flecha negra continua indica los días pi consecutivos y la flecha negra segmentada indica los días pi no consecutivos.

2.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS)

Con el fin de determinar si la lidocaína y el KA interactúan químicamente al hallarse juntos en solución, diferentes soluciones de lidocaína (a diferentes concentraciones) y soluciones mezcla de lidocaína y KA (**Tabla 2.4**) fueron analizadas mediante un equipo de HPLC (HPLC-MS Agilent 1100 LC-MSD), con columna de C-18 (tamaño de partícula 5 μ m, 4,6 x 150 mm), acoplado con un espectrómetro de masa de cuadrupolo. La ionización de las muestras se

realizó con el método de ESI/APCI (ionización por electrospray/ionización química a presión atmosférica), utilizados tanto en modo positivo como negativo. La fase móvil utilizada fue una mezcla isocrática de acetonitrilo y de ácido fórmico 0,5 % en agua (70:30).

La cromatografía líquida consiste en el uso de una fase estacionaria, almacenada o empaquetada dentro de una columna y una fase móvil, que se desplaza a través de la fase estacionaria en su recorrido a través de la columna. Cada sustancia problema atravesará la columna junto con la fase móvil a una velocidad que estará influida por la afinidad que posea por la fase estacionaria, siendo posible detectar las diferentes sustancias individuales a su salida de la columna (Synder *et al.*, 2010).

Solución	Concentración
Lidocaína	0,5 %
Lidocaína	1 %
Lidocaína	2 %
KA	1 mM
KA; lidocaína	1 mM; 0,5 %
KA; lidocaína	1 mM; 1 %
KA; lidocaína	1 mM; 2 %

Tabla 2.4. Soluciones analizadas mediante HPLC acoplada a espectrómetro de masas (MS). Todas las diluciones fueron realizadas con cloruro de sodio 0,9 %.

El proceso comienza con la inyección de la muestra en la columna. El solvente o fase móvil es bombeado en forma continua a través de la columna y las sustancias que se van extrayendo son detectadas por un sensor a medida que salen de la columna. El gráfico que se genera a través de la lectura del detector en función del tiempo constituye el cromatograma (**Fig. 2.3**). Cada sustancia que abandona la columna es registrada por el detector y genera un “pico” en el cromatograma. El tiempo al cual ese pico es registrado es el tiempo de retención

(t_r) para esa sustancia y constituye una especie de “huella digital”. Por otro lado, el área bajo la curva o la altura del pico (tomada desde la base), permiten estimar la concentración de la sustancia que le dio origen.

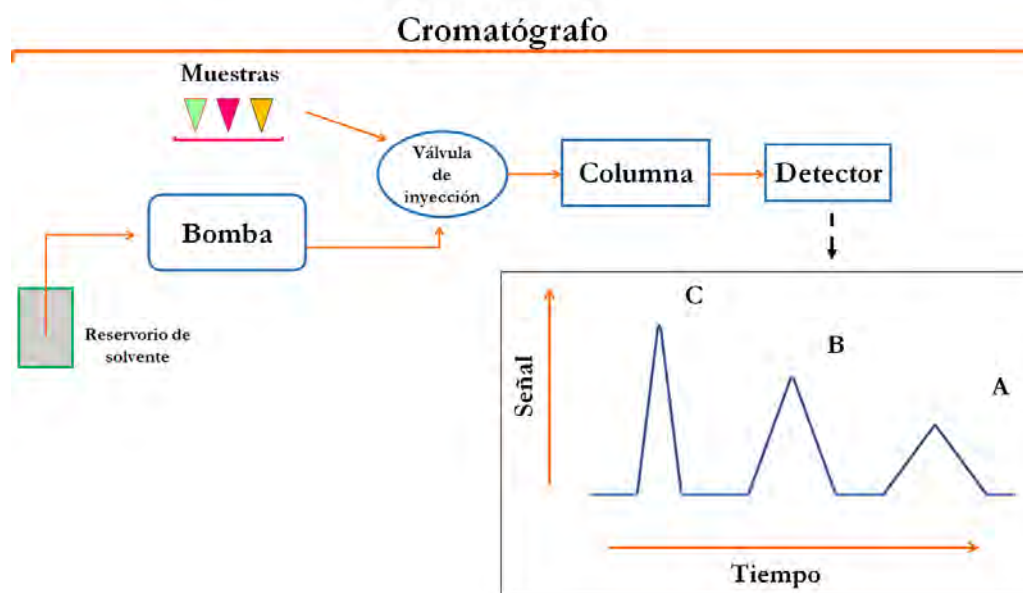


Figura 2.3. Esquema del equipo HPLC utilizado, donde el sentido de las flechas indica el flujo de la fase móvil, seguido de un cromatograma tipo para tres sustancias (A, B y C). Modificado de [Synder *et al.*, 2010](#).

La detección de sustancias mediante espectrometría de masa (EM) es una de las técnicas más utilizadas actualmente y se ha convertido en el método estándar para todos los estudios bioanalíticos. El espectrómetro de masa consta de los siguientes componentes (**Fig. 2.4**):

- Sistema de introducción de la muestra
- Fuente de iones
- Analizador o separador de iones
- Detector
- Sistema para la recolección y procesamiento de los datos

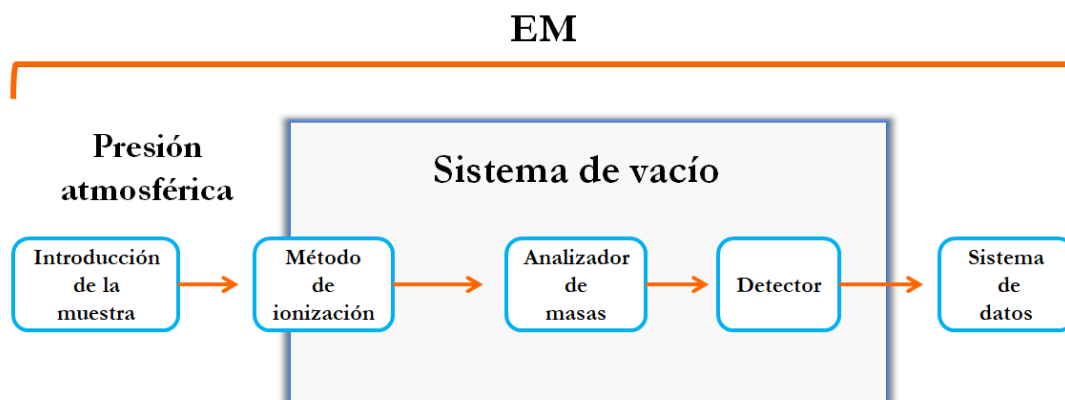


Figura 2.4. Esquema del equipo de EM utilizado.

En este caso, el sistema de introducción de las muestras está constituido por el cromatógrafo que se detalló anteriormente. La fuente de iones es el lugar en el que se generan los iones a partir de las moléculas de muestra neutras, que fueron previamente separadas por el cromatógrafo. En este caso, el método utilizado para la generación de los iones fue el de ESI. El analito en solución es convertido, mediante reacciones redox, en gotas cargadas que se nebulizan, mediante la aplicación de un cierto voltaje y a una presión controlada, dentro del capilar. Las gotas cargadas ingresan en el capilar de salida que se halla a alta temperatura (100-300 °C), donde el solvente se evapora dejando al analito en fase gaseosa. Este es un método de ionización suave, mediante el cual el ion pseudomolecular (catión o anión con número par de e) sufre poca fragmentación ya que tiene poco exceso de energía. Los iones pseudomoleculares más comunes son: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+CH_3COO]^-$, donde M=molécula de la muestra.

El analizador más difundido, y que se utilizó para este análisis, es el cuadrupolo, quien selecciona los iones, separándolos espacialmente según su relación masa/carga (m/z). Estos iones llegan al detector que traduce el impacto de un ion en una señal eléctrica medible y registrable por el sistema de recolección de

datos que, en este caso, fue una computadora equipada con un programa específico. Finalmente, el detector genera una representación bidimensional de abundancia de iones en función de su relación m/z , el espectro de masas. Este espectro de masas es específico para cada sustancia (para un método de ionización determinado), y permite identificar compuestos. La **Fig. 2.5** muestra esquemáticamente el proceso completo.

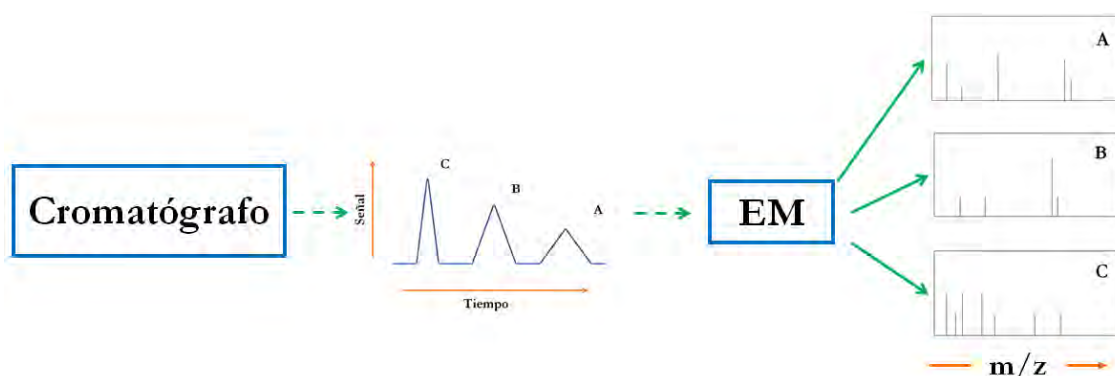


Figura 2.5. Esquema del proceso completo, desde la introducción de la muestra problema en el cromatógrafo hasta la obtención de los espectros de masas correspondientes a los diferentes componentes de la muestra original.

2.5 Inyección intraparenquimatosa en el segmento cervical C5

La inyección intraparenquimatosa de sustancias es la forma más efectiva para la descarga de drogas dentro de la médula espinal, ya que permite inyectar soluciones y/o suspensiones en áreas específicas y restringidas, sin pérdida de título (Dib, 1984; Federici *et al.*, 2012; Lepore *et al.*, 2007). Esto constituye su principal ventaja, ya que permite limitar la acción de los compuestos de interés a las áreas preestablecidas, o a poblaciones celulares específicas dentro de éstas (Franz *et al.*, 2009; Lepore *et al.*, 2007; Peluffo *et al.*, 2013; Snyder *et al.*, 2011). Como contrapartida, al tratarse de una técnica quirúrgica invasiva, suele asociarse a un daño tisular más extenso, a una mayor dificultad para la

estandarización de los diferentes procedimientos e incluso a un mayor costo, cuando se la compara con otras vías como, por ejemplo, la intratecal (Ineichen *et al.*, 2016). Sin embargo, las inyecciones intraparenquimatosas se consideran promisorias y han demostrado ser precisas y seguras en modelos animales (Franz *et al.*, 2009).

La trepanación dorsal fue propuesta, a su vez, como una técnica útil para la inoculación intraparenquimatosa de soluciones dentro de la médula espinal. Esta técnica es fácil y rápida de realizar, no requiere del uso de un aparato estereotáxico para la sujeción del animal, no genera daño tisular evidente y permite una óptima recuperación posquirúrgica (Nishida, 2014a; Nishida *et al.*, 2014c).

La inyección intraparenquimatosa de las diferentes soluciones, en las diferentes etapas de este trabajo (etapas 1, 2 y 3), se llevó a cabo en el segmento C5 de la médula espinal, según lo descrito por Nishida (2014a). La elección del sitio de inyección tuvo en cuenta el hecho de que este segmento, junto con los segmentos C3 y C4, alberga las neuronas motoras responsables de la innervación del diafragma y de los miembros torácicos de la rata (Franz *et al.*, 2009). De este modo, los efectos de las sustancias inyectadas pueden manifestarse mediante cambios en la movilidad del cuello o los miembros torácicos del animal, y en su respiración (Nishida, 2014a).

Brevemente, los animales se anestesiaron mediante una inyección de clorhidrato de ketamina (80 mg/Kg; i.p.) seguida de una inyección de xilacina (8 mg/Kg; i.m.). Posteriormente, los animales se colocaron en posición de decúbito ventral (**Fig. 2.6**), sobre la mesa de trabajo previamente cubierta con una almohadilla térmica (Almohadilla eléctrica Standard 3012 SAN UP®, SAN UP S.A, San Martín, Buenos Aires, Argentina), con el propósito de mantener la temperatura corporal del animal durante el procedimiento quirúrgico. Luego, se les practicó una incisión en la piel de aproximadamente 2,0 - 2,5 cm de largo, desde la cresta

occipital hasta la apófisis espinosa de la vértebra T2. Se incidió la porción cervical del músculo trapecio (*Trapezius*) en la línea media (aponeurosis común). Después de la divulsión, los músculos romboide cervical (*Rhomboideus cervicis*) y esplenio cervical (*Splenius cervicis*) se retrajeron mediante un sostenedor autoestático, lo que permitió exponer el músculo recto dorsal mayor de la cabeza (*Rectus capitis dorsalis major*). Este músculo, que cubre los grandes procesos laterales de la vértebra C2, se utilizó como una guía para cortar el músculo erector de la columna (*Musculi erector spinae*) (5 mm en caudal, a partir del músculo recto dorsal mayor de la cabeza) y, de esa manera, se expuso el arco vertebral C4. Una vez que se identificaron los arcos vertebrales C4 y C5, se expuso el área para acceder al segmento C5. Para ello, se practicó un pequeño orificio en el disco intervertebral C4-C5, 1 mm en lateral a la línea media (apófisis espinosa dorsal). La trepanación se llevó a cabo mediante una fresa dental redonda de 0,8 mm de diámetro, montada sobre un taladro rotatorio de alta velocidad (Dremel MultiPro 395JP, Méjico, Méjico). Se introdujo la punta de una aguja de acero calibre 26G, montada en una jeringa Hamilton® de 10 µl, de manera vertical, 3 mm hacia abajo en el lado derecho de la médula espinal para llegar, técnicamente, a la lámina VI del mismo lado. La punta de la aguja se mantuvo en el lugar durante 2 min, antes y después de la descarga de la solución, a fin de evitar la pérdida del líquido inyectado por efecto del reflujo. La descarga de 5 µl totales se llevó a cabo a razón de 1 µl/min. En todos los casos, la inyección se realizó en la hemimédula derecha, y se conservó la izquierda como control ([Franz et al., 2009](#)). Por último, se removió la aguja, y se suturaron los músculos superficiales y la incisión de la piel. Los animales regresaron a su jaula, se alojaron en un cuarto de recuperación hasta pasados los efectos de la anestesia y se supervisaron cada 20 min. El cuarto de recuperación se encontraba separado del sitio de alojamiento de los animales y contaba con temperatura controlada. Una vez recuperados, los animales se

ubicaron en el sector de alojamiento común con las características previamente mencionadas (sección 2.1), hasta el momento de la realización de las pruebas comportamentales y la eutanasia.

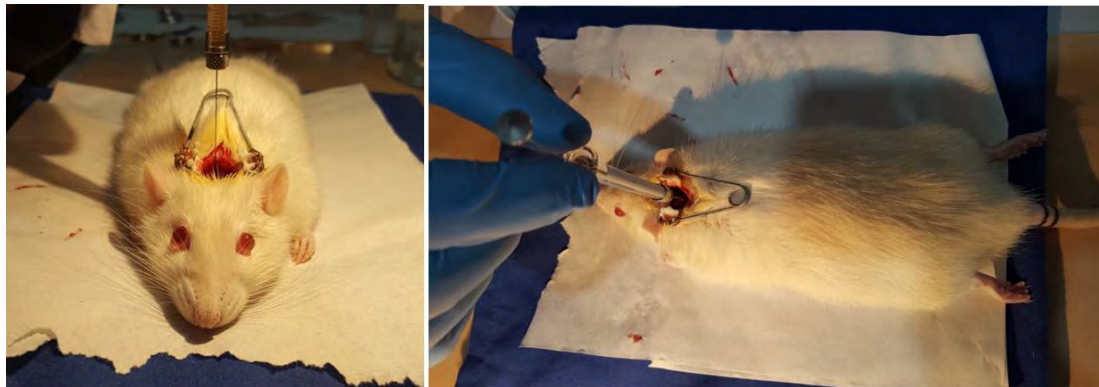


Figura 2.6. Vista frontal y superior del animal durante la inyección intraparenquimatosa.

2.6 Inyección en Cisterna Magna

El LCR es producido en los plexos coroideos presente en los ventrículos laterales, tercero y cuarto del cerebro. Este líquido se distribuye por todos los ventrículos cerebrales, cisternas y surcos, así como por el canal central de la médula espinal y por los espacios subaracnoideos del cerebro y de la médula espinal.

Teniendo en cuenta la proximidad de la Cisterna Magna con respecto al canal medular, la posibilidad de acceder a ella sin necesidad de procedimientos invasivos y, que el LCR que allí circula se esparcirá por entre las meninges y finalmente se descargará en el canal central medular, se seleccionó esta vía como la más adecuada para el ensayo de una posible terapia a ser administrada en forma posterior al daño excitotóxico causado por el KA.

Por ello, en la tercera etapa experimental, los animales que habían recibido KA por vía intraparenquimatosa en el día 0, recibieron una inyección con un

volumen total de 30 µl de cloruro de sodio 0,9 % o de lidocaína 0,5 % (según el grupo experimental), en la Cisterna Magna, el día 3 pi. Para ello, los animales fueron anestesiados con una inyección de clorhidrato de ketamina (80 mg/Kg; i.p.) seguida de xilacina (8 mg/Kg; i.m.). A continuación, se inmovilizaron mediante un aparato estereotáxico tipo Kopf. Previo a la inyección, se removió el pelaje de la zona dorsal de la piel y se localizó la zona de inyección entre el hueso parietal y la columna vertebral por palpación. Finalmente, se introdujo verticalmente una aguja de calibre 31G acoplada a una jeringa para insulina (BD Ultra-Fine, 1 ml, 6 mm x 0,25 mm, Calibre 31 G), a una profundidad de entre 1,5-2,0 mm y se realizó la descarga de la solución (**Fig. 2.7**).

Posteriormente, los animales fueron devueltos a sus cajas y se mantuvieron en observación en el cuarto de recuperación hasta pasados los efectos de la anestesia. Una vez recuperados, se alojaron en el espacio común destinado a tal fin descrito previamente (sección 2.1), hasta el momento de la realización de las pruebas comportamentales y la eutanasia.

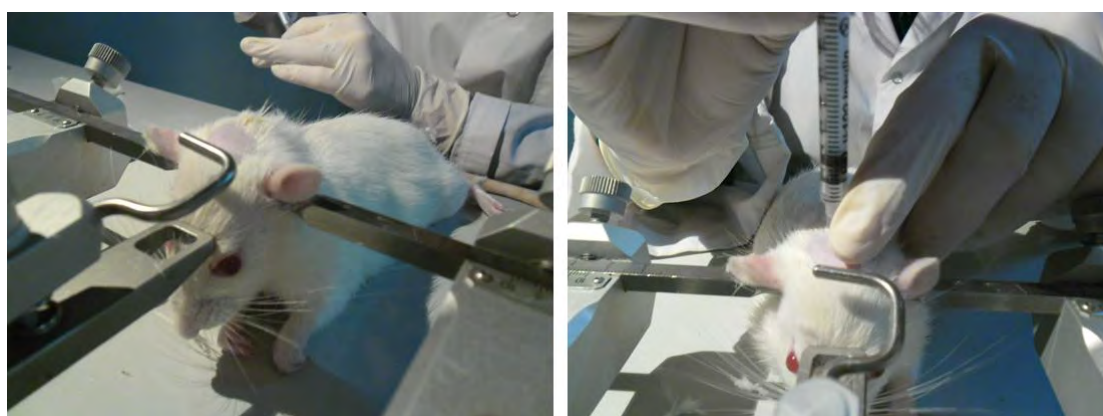


Figura 2.7. Inyección en cisterna magna. Izquierda: El animal fue fijado mediante un aparato estereotáxico. Derecha: Inyección de la solución de lidocaína 0,5 % en la cisterna magna.

2.7 Evaluación clínica

Durante los días en que se desarrollaron los experimentos, los animales fueron examinados desde el punto de vista clínico y se registró el estado general y el peso.

2.7.1. Evaluación del peso

Todos los animales, ya fueran controles o experimentales, fueron pesados antes de la cirugía (día 0) y posteriormente, en todos los días experimentales planteados y en forma previa a la eutanasia, haciendo uso de una balanza portátil (Digital Kitchen Scale SF-400; Máx: 7 Kg). Los valores obtenidos en cada día para cada animal fueron registrados y procesados, de modo que se obtuvo para cada animal, (y por extensión para cada grupo), la ganancia de peso diaria que fue volcada en el gráfico correspondiente.

2.8 Pruebas de comportamiento

Durante los días en que se desarrollaron los experimentos, los animales también fueron evaluados en su comportamiento motriz y sensitivo. Todos los animales fueron sometidos a un conjunto de pruebas de comportamiento seleccionados y adaptados de Carter (1991), Metz & Whishaw (2002, 2009), Milano *et al.* (2008), Mitra *et al.* (2013) and van Eick (1967), en los días experimentales planteados, de acuerdo con cada etapa experimental. Estas pruebas tuvieron como objetivo evaluar el estado funcional de los animales, el cual dependía de la localización y el grado de la lesión medular (Sedý *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos permitieron cuantificar el impacto del experimento sobre las

funciones motoras y sensitivas de los animales. Se utilizaron dos pruebas motoras y una prueba sensitiva.

2.8.1 Prueba sensitiva

2.8.1.1 Sensibilidad al calor

El animal se posicionó dentro de un contenedor con paredes de policarbonato transparente y cuya base estaba formada por una platina térmica con temperatura regulable. Una vez que el animal se ubicó dentro de dicho contenedor, se colocó la tapa y se dio comienzo al registro fílmico de la prueba (**Fig. 2.8**). En cada día planteado, se llevó a cabo una sesión durante la cual cada animal cumplimentó un total de 3 registros, con intervalos de 5 min como mínimo entre cada intento. Todas las sesiones se registraron mediante la opción de video de una cámara fotográfica digital de alta resolución (Panasonic LUMIX DMC-FH1PR-K, AVC Networks Xiamen Co., China).

Cada uno de los videos fue posteriormente analizado cuadro por cuadro para obtener el tiempo de latencia por intento, definido como el tiempo (en seg) que transcurre desde que el animal apoya el miembro torácico derecho sobre la platina hasta que la retira o hasta la primera señal de reacción a la temperatura. (**Video A.1**, en el Anexo 1). Finalmente, se obtuvo el tiempo medio de latencia (en seg) para cada animal y para cada día experimental planteado.

La temperatura de la platina se mantuvo en $55 \pm 0,5$ °C a lo largo de los ensayos (Carter, 1991; Mitra *et al.*, 2013). El tiempo máximo que los animales podían permanecer dentro del contenedor fue fijado en 20 seg. Si bien diversos autores describen valores de corte para la prueba de entre 60 seg (Carter, 1991; Sedý *et al.*, 2008) y 90 seg (Milano *et al.*, 2008), en nuestro caso este límite se fijó en 20 seg, a fin de evitar daño tisular por efecto de la temperatura.



Figura 2.8. Prueba de platina caliente. El animal se halla dentro del recipiente con su miembro torácico derecho posicionado sobre la platina térmica.

2.8.2 Pruebas motoras

2.8.2.1 Prueba de suspensión en el aire

Se fundamenta en la función de agarre natural de los miembros del animal. Esta prueba motora permite evaluar la funcionalidad de los músculos anteriores (cuello y miembros) con lesiones a nivel cervical de la médula espinal (Sedý *et al.*, 2008; Nishida *et al.*, 2011).

El animal se posicionó sobre un cilindro de 8 cm de diámetro, recubierto por una malla plástica con un tamaño de poro de 0,5 cm, y elevado a una distancia fija (15 cm) sobre un recipiente rectangular (90 x 50 x 30 cm) que contenía, aproximadamente, 5 cm de agua tibia (**Fig. 2.9**). Una vez que el animal se sujetaba a la malla se giraba el cilindro, con lo cual el animal quedaba suspendido en el aire sobre la superficie del agua (**Video A.2**, en el Anexo 1).

En cada día planteado, se llevó a cabo una sesión durante la cual cada animal cumplimentó un total de 3 registros, con intervalos de 5 min como mínimo entre los intentos.

Para cada intento, se registró el tiempo (en seg), mediante el uso de un cronómetro, durante el cual el animal se mantuvo sujeto a la malla del cilindro. Para cada animal, se obtuvo el tiempo medio de suspensión (en seg) para cada día planteado.



Figura 2.9. Prueba de suspensión en el aire. Izquierda: El animal posicionado sobre la malla. Derecha: El animal permanece sujeto a la malla y suspendido sobre el agua.

2.8.2.2 Desplazamiento en escalera horizontal

Esta prueba permite evaluar la habilidad de los animales para caminar, así como también el posicionamiento de las patas delanteras y traseras y la coordinación entre miembros. Es útil para evaluar la pérdida y la recuperación de la función motora luego de lesiones de la médula espinal, así como también, procesos compensatorios a través de los cuales los animales se adaptan a lesiones del sistema nervioso (Metz & Whishaw, 2002). Los animales no requieren entrenamiento previo para llevar a cabo la prueba y, a través del registro filmico, es posible realizar un análisis detallado cuali o cuantitativo de los resultados.

Durante esta prueba los animales fueron estimulados a caminar sobre una superficie formada por varillas ubicadas a una distancia variable en cada intento (Video A.3, en el Anexo 1).

La escalera horizontal consiste en 2 paredes de policarbonato transparentes de 100 cm de largo y 20 cm de alto, unidas entre si mediante peldaños de metal. Los peldaños de ambos extremos son fijos y mantienen la estructura del aparato mientras que las varillas pueden extraerse para modificar la distancia entre sí y crear patrones diferentes (Fig. 2.10). El cambio en la distancia de las varillas minimiza la posibilidad de los animales de compensar un posible impedimento en la funcionalidad de un miembro mediante el aprendizaje y, de este modo,

permite y valida el uso de esta prueba en forma repetida (Metz & Whishaw, 2002). El ancho del dispositivo puede ajustarse al tamaño del animal ± 1 cm, a fin de evitar que la rata pueda volverse en lugar de dirigirse hacia adelante.

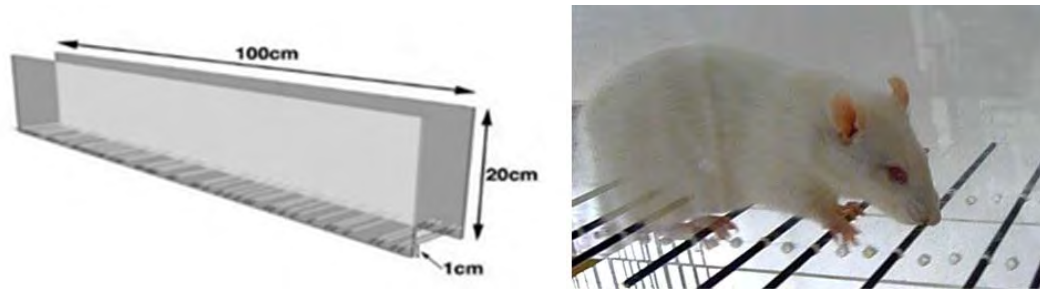


Figura 2.10. Izquierda: esquema del dispositivo y dimensiones. Derecha: El animal se desplaza a través de la escalera.

Durante cada sesión, la escalera se posicionó elevada sobre la superficie de trabajo a aproximadamente 30 cm. Al inicio del recorrido se colocó una caja vacía y al final de la escalera, la caja común con los compañeros de grupo, que funcionó como estímulo positivo para el animal. Cada animal realizó un total de 3 registros por sesión, con intervalos de 5 min como mínimo entre sí. Todos los intentos se registraron mediante la opción de video de una cámara fotográfica digital de alta resolución (Panasonic LUMIX DMC-FH1PR-K, AVC Networks Xiamen Co., China), y fueron posteriormente analizados cuadro por cuadro.

La evaluación cuantitativa se realizó en base a la escala categórica propuesta por Metz & Whishaw (2002), que califica las posturas que toman los miembros sobre las varillas en pasos consecutivos, y les otorga valores entre 0 y 6 (**Tabla 2.5**). Posteriormente, estas categorías se reagruparon para facilitar el análisis de acuerdo con los requerimientos de nuestro estudio, y según Metz & Whishaw (2009). De acuerdo con esto, las categorías 0, 1, 2 son consideradas “errores” (Grupo A), mientras que las categorías restantes se consideran como “no errores” (Grupo B) (**Tabla 2.6**).

Categoría	Tipo	Descripción
0	Error total	Fallo del apoyo del miembro sobre la varilla, el miembro no toca la varilla
1	Caída profunda	Deslizamiento del miembro desde la varilla y consecuente caída
2	Caída leve	Deslizamiento del miembro desde la varilla y consecuente caída leve
3	Reubicación	El miembro se apoya en una varilla, pero se posiciona en otra diferente antes de continuar el ciclo
4	Corrección	El miembro inicialmente direccionado hacia una varilla se posiciona sobre otra
5	Ubicación parcial	El miembro es apoyado en la varilla mediante los dedos
6	Ubicación correcta	El miembro es apoyado en la varilla mediante la palma del miembro delantero

Tabla 2.5. Escala categórica según Metz & Whishaw (2002).

Grupo A	Grupo B
Categoría 0	Categoría 3
Categoría 1	Categoría 4
Categoría 2	Categoría 5
	Categoría 6

Tabla 2.6. Reagrupamiento de las categorías en grupos A y B

2.9 Eutanasia de los animales y extracción de los órganos de interés

En cada tiempo de eutanasia planteado, los animales correspondientes fueron anestesiados con ketamina (80 mg/Kg, i.p.) y xilacina (8 mg/Kg, i.m.). Una vez alcanzado el plano anestésico deseado, se llevó a cabo la perfusión por vía intracardiaca; inicialmente, se perfundió con solución tamponada de fosfatos (PBS; pH=7,4), para el lavado del sistema vascular, seguido de la solución fijadora de paraformaldehído (PFA 4 %; pH=7,4). Se perfundió a una velocidad

de 12 ml/min con una bomba peristáltica (Minupuls 3, MP Drive Unit. Gilson SAS, France).

Para acceder al interior de la cavidad torácica se retiró el esternón, seccionando las costillas en la unión costochondral (**Fig. 2.11**). Una vez expuesto el corazón, se efectuó una incisión en el vértice del pericardio y se procedió a canular la arteria aorta a través del ventrículo izquierdo. Inmediatamente después, se realizó un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito.

Una vez finalizada la fijación, se realizó la necropsia y se extrajo el sistema nervioso, que fue post-fijado en solución de formol tamponada durante 24 h. El material se conservó en *freezer* de -20 °C en solución criopreservante (30 % de sacarosa + 3 % de etilenglicol en PB 0,4 M), hasta el momento de su procesamiento.



Figura 2.11. -Izquierda. Bomba utilizada para la perfusión de los animales.



-Derecha. Imagen de un animal durante la perfusión intracardiaca.

2.10 Seccionamiento de la médula espinal

Se identificaron los diferentes segmentos cervicales y se realizó el corte coronal de cada uno de ellos haciendo uso de una cuchilla descartable. La identificación se llevó a cabo en el órgano entero tomando como referencia la emergencia de las raíces nerviosas. Cada segmento está constituido por las raíces nerviosas sumado al tejido medular que contribuye a la formación de dichas raíces, tanto hacia craneal como hacia caudal (**Fig. 2.12**).

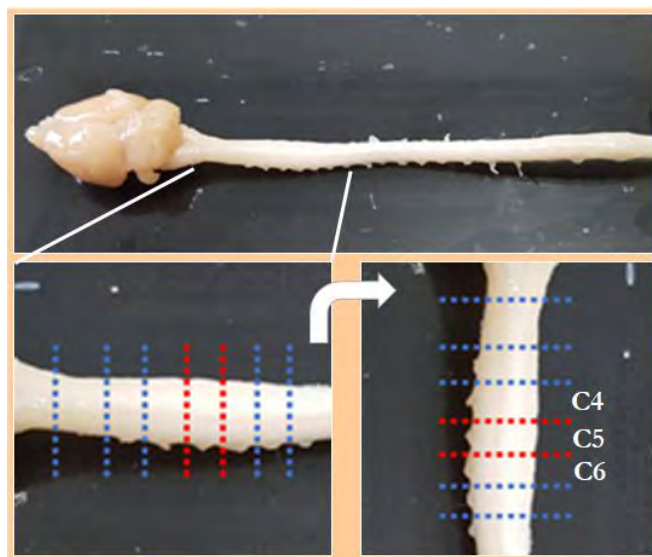


Figura 2.12. Arriba: Médula espinal entera, se observan las emergencias de las raíces nerviosas. Abajo: ampliación de la región cervical (izquierda) e identificación de los segmentos de interés (derecha).

Cada segmento se colocó en un pocillo de una placa multipozo de 96 pocillos con fondo plano (Nunc-Immuno™ MicroWell™), con la superficie a seccionar orientada hacia arriba. Estos pocillos se rellenaron posteriormente con una solución de agarosa (sacarosa 10 %, agarosa de bajo punto de fusión [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO] 4 %; en PBS, pH=7,4) y se conservaron a 4 °C en heladera durante 2 h. Los bloques obtenidos fueron cortados de manera seriada en secciones de 20 µm de espesor mediante un micrótopo por vibración

(vibrátomo Leica VT 1000S, Alemania), y posteriormente fueron montados sobre portaobjetos recubiertos con gelatina (gelatina comestible al 2 %, en agua destilada).

2.11 Histoquímica

Para la apreciación de la estructura general del órgano y la determinación morfológica y morfométrica de las neuronas, cortes pertenecientes a los diferentes grupos experimentales fueron teñidos con violeta de cresilo, un colorante catiónico que permite evidenciar cuerpos neuronales y sustancia de *Nissl*.

Los cortes se deshidrataron durante 1 h en alcohol 100°, y luego se incubaron durante 30 min en la solución de violeta de cresilo al 2 %. Las muestras teñidas se deshidrataron a través del paso consecutivo por alcoholes de gradación creciente (96° y 100°), finalizando en dos pasajes en xilol. Por último, se realizó el montado con bálsamo de Canadá.

Para la marcación de mielina, se utilizó la tinción con *Luxol Fast Blue*, y contraste de violeta de cresilo. Los cortes previamente montados en vidrios gelatinizados se incubaron en alcohol 96° durante 90 min, a temperatura ambiente. A continuación, se sumergieron en la solución de *Luxol* durante 120 min, en estufa a 60 °C. Una vez teñidos de azul, se lavaron para eliminar el exceso de colorante mediante un pasaje rápido por alcohol 96°, seguido de otro lavado con agua destilada. Posteriormente, se llevó a cabo la diferenciación en carbonato de litio durante 30 seg, seguido de un lavado con alcohol 70°, y un último lavado con agua destilada. Estos tres lavados secuenciales se repitieron tantas veces como fueron necesarias hasta obtener el mejor contraste entre la sustancia blanca (celeste) y la sustancia gris (verde oscuro). Seguidamente, los cortes se incubaron con una solución de violeta de cresilo al 2 % durante 20 min, se

diferenciaron rápidamente en alcohol 96° y se lavaron en alcohol 100° durante 5 min. Finalmente, se lavaron con xilol y se montaron con bálsamo de Canadá.

2.12 Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ)

Se aplicaron técnicas estandarizadas para la observación de diferentes marcadores específicos neuronales, de células gliales, de células endoteliales, de filamentos intermedios propios de las neuronas y para la detección de células en proliferación.

Los cortes que se hallaban originalmente inmersos en solución criopreservante fueron sumergidos en PBS durante 10 min para eliminar el exceso de la solución, y posteriormente incubados con agua oxigenada (H_2O_2) de 100 volúmenes 0,03 %, en PBS, durante 30 min, para la inactivación de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS de 5 min cada uno. Luego, se aplicó la técnica de recuperación antigénica, con el propósito de conseguir el desenmascaramiento de los epitopes antigénicos, mediante la reversión de las ligaduras proteicas del tejido, originadas por la acción del formaldehído usado como fijador. Las secciones de tejido fueron colocadas en un dispositivo múltiple para la recuperación de antígenos (**Fig. 2.13**), con 100 ml de solución tamponada de citrato, pH=6, en cada uno de los pozos a utilizar. Las muestras contenidas dentro del dispositivo múltiple fueron sometidas a tres ciclos de calentamiento (de 3 min cada uno) en un horno de microondas (Whirlpool WMD20SB, Whirlpool® Argentina S.A, C.A.B.A, Argentina). El primero de los ciclos se realizó con una potencia máxima (P10), mientras que los dos subsiguientes se realizaron a una potencia menor (P5). Finalmente, se dejaron reposar hasta alcanzar temperatura ambiente. Luego de dos lavados de 5 min cada uno con PBS, se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas mediante incubación con albúmina sérica bovina (BSA 1 %) en cámara húmeda,

durante 30 min, a temperatura ambiente, y a la posterior incubación con el anticuerpo primario correspondiente, también en cámara húmeda y a 4 °C, durante 24 h. Los diferentes anticuerpos primarios utilizados se detallan en la **Tabla 2.7**.



Figura 2.13. Dispositivo múltiple para la recuperación de antígenos

Anticuerpo	Clon	Abreviatura	Dilución	Especificidad
Proteína nuclear específica de neuronas	Monoclonal	NeuN	1:200	Núcleo y citoplasma de neuronas.
Proteína glial fibrilar	Policlonal	GFAP	RTU ^a	Astroцитos; células gliales de Bergmann.
Neurofilamento	Monoclonal	NF	1:100	Tejidos neuronales; axones de neuronas.
Antígeno nuclear de células en proliferación	Monoclonal	PCNA	1:3000	Núcleo de células en proliferación.

Tabla 2.7. Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica. Las diluciones necesarias se realizaron usando BSA 0,1 % como diluyente. ^a RTU=listo para usar (del inglés, *Ready To Use*)

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con PBS, de 5 min cada uno. Como detector y amplificador se utilizó el sistema EnVision® (EnVision® + system HRP labelled polymer anti-mouse y anti-rabbit Dako-Cytomation, USA). Este sistema cuenta con un polímero de dextrano marcado con la enzima peroxidasa y conjugado con inmunoglobulinas, lo cual le brinda la capacidad de unirse al anticuerpo primario. Mediante este método, la enzima peroxidasa asociada al polímero actúa sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se agrega junto con el sistema revelador. El producto de esta reacción, a su vez, reacciona con un dador de electrones (cromógeno) que, finalmente, genera la formación de un producto coloreado insoluble y agua. La 3',3'-diaminobencidina (DAB) se utilizó como cromógeno, por su capacidad de reaccionar con el producto de esta reacción enzimática y generar un precipitado pardo en los sitios de unión de los anticuerpos con los antígenos de interés. Para la contra-coloración de los tejidos marcados mediante esta técnica se utilizó hematoxilina, de modo que las regiones inmunomarcadas positivamente se evidenciaron con una coloración pardo-dorada oscura, producto de la oxidación del DAB, mientras que los núcleos del resto de las células se observaron de color azulado. Finalmente, las muestras se deshidrataron a través del paso por alcoholes de gradación creciente. Luego de dos lavados finales en xilol, se realizó el montaje con bálsamo de Canadá.

2.13 Técnica de Inmunofluorescencia (IF)

Para la realización de esta técnica se procedió al lavado de los cortes que se encontraban en líquido criopreservante, mediante PBS, durante 10 min, tal como se describió para la técnica de IHQ. Sin embargo, al PBS utilizado se le adicionó 0,05 % de Tween 20 (Polysorbat 20, Merck KGaA, EMD Millipore,

Alemania). El Tween 20 es un surfactante no-iónico que aumenta la sensibilidad y la especificidad de la unión de los anticuerpos a los antígenos específicos, así como también reduce el fondo que se produce durante el revelado de la técnica. El procedimiento realizado fue similar al detallado para la técnica de IHQ, sólo que se reemplazó el sistema de detección (EnVision®) por un anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo) conjugado con compuestos fluoresceinados, que permitieron su observación a través de microscopio de fluorescencia o confocal (**Tabla 2.8**). Esta técnica permite la marcación de una sola proteína (marcación simple) o de dos o más (marcación múltiple) de manera simultánea.

Todos los cortes fueron incubados, además, con el marcador de contraste nuclear DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) durante 15 min. El DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN (marcación nuclear). Su máxima absorción se obtiene a una longitud de onda de 358 nm (ultravioleta), mientras que su máxima emisión se produce a 461 nm (azul).

Los cortes fueron montados en un medio acuoso específico (Fluoromount - FluorSave™ Reagent, Calbiochem, Alemania), solución que permite extender los tiempos de fluorescencia de los fluorocromos.

Fluoróforo	Clon	Dilución	Color de emisión
Alexa 488 anti-ratón	Monoclonal	1:1000	Fluorescencia verde
Alexa 555 anti-ratón	Monoclonal	1:1000	Fluorescencia roja
Alexa 555 anti-conejo	Policlonal	1:1000	Fluorescencia roja
DAPI		1:1000	Fluorescencia azul

Tabla 2.8. Fluoróforos unidos a anticuerpos utilizados para la detección de anticuerpos primarios en los estudios de IF.

2.14 Fluoro-Jade B

El Fluoro-Jade es un fluorocromo aniónico derivado de la fluoresceína, que se utiliza en neurociencia para la marcación de neuronas en degeneración, ya que tiñe específicamente el soma y las neuritas de las neuronas degeneradas uniéndose a una sustancia básica actualmente desconocida, muy probablemente una poliamina (Liu y col., 2009). Para el procesamiento mediante esta técnica, las secciones del segmento C5 se montaron sobre vidrios gelatinizados. Se les realizó un pasaje de 5 min por una solución de hidróxido de sodio (NaOH 1 % en alcohol 80 %), seguido de otro pasaje de 2 min por una solución de alcohol 70 %. A continuación, se lavaron durante 2 min en agua destilada y luego se colocaron en una solución de permanganato de potasio (KMnO₄ 0,06 % en agua destilada) durante 10 min y con agitación. Se realizó otro lavado en agua destilada durante 2 min y, posteriormente, se los sumergió durante 20 min en la solución de Fluoro-Jade B (FluoroJade® B, AG310, Millipore, Temecula 92590, California, USA). Luego, se realizaron 3 lavados en agua destilada de 1 min cada uno, se dejaron secar y finalmente se deshidrataron en xilol y se montaron con bálsamo de Canadá.

2.15 Técnica de CLARITY

CLARITY es el acrónimo de **C**lear **L**ipid-exchanged **A**crylamide-hybridized **R**igid **I**maging/**I**mmunostaining/***I**n situ* hybridization-compatible **T**issue **h**Ydrogel (Chung *et al.*, 2013). Esta técnica permite la transformación de los tejidos intactos en un híbrido en el que los componentes específicos son reemplazados con elementos exógenos que proveen o mejoran la accesibilidad de los fotones, fluoróforos y anticuerpos, que en condiciones normales tienen una capacidad de penetración limitada (Chung & Deisseroth, 2013; Kuwajima

et al., 2013). Su principal ventaja es que permite el marcado y la observación de estructuras subcelulares y proyecciones de largo alcance (Tomer *et al.*, 2014).

Las muestras de interés (secciones de órganos u órganos enteros), se incuban durante 3 días en una solución que contiene para-formaldehído, monómeros de acrilamida y bis-acrilamida, y un catalizador (solución hidrogel). Durante este tiempo la solución difunde en el tejido y las moléculas de formaldehído reaccionan con los grupos amino presentes en las biomoléculas (tales como proteínas, ADN y ARN) y con los monómeros de acrilamida y bis-acrilamida, de modo que se generan uniones débiles (**Fig. 2.14-A**). Luego, se someten a una incubación de 3 h de duración, a 37°C, con agitación. El resultado es la formación de un híbrido (entre el tejido y la malla de hidrogel), a raíz de la polimerización de los monómeros presentes en la solución hidrogel y la consolidación de las uniones débiles preformadas (**Fig. 2.14-B**). Esta polimerización es iniciada por el catalizador, que se activa conforme aumenta la temperatura, y que puede inactivarse en presencia de O₂. Posteriormente, la muestra se desprende del gel formado y se incuba con una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) en ácido bórico (solución clarificante), hasta la obtención de la muestra ópticamente transparente (**Fig. 2.14-C**). Esta etapa se puede realizar de forma activa, de forma pasiva, o utilizando una combinación de ambos procesos. La forma activa involucra el uso de la electroforesis, que aprovecha la carga de las micelas de SDS para acelerar el paso de estas a través del tejido y con ello, la remoción de los lípidos; mientras que la forma pasiva se basa en la incubación de las muestras con la solución, lo que permite la libre difusión de las micelas en el tejido lo que, a su vez, puede favorecerse mediante el recambio asiduo de la solución y el uso de un agitador.

El método pasivo, aunque más lento, es el más gentil con la muestra. A su vez, es el que permite la mayor transparencia final y, por ende, mayor resolución axial de la imagen y mayor accesibilidad de los anticuerpos, a la vez que

constituye la alternativa más económica (Tomer *et al.*, 2014). La duración total de la etapa de clarificación depende, en definitiva, del tamaño de las muestras. Una vez obtenidas las muestras ópticamente transparentes, se traspasan a una solución de lavado, en la cual pueden permanecer hasta su posterior procesamiento.

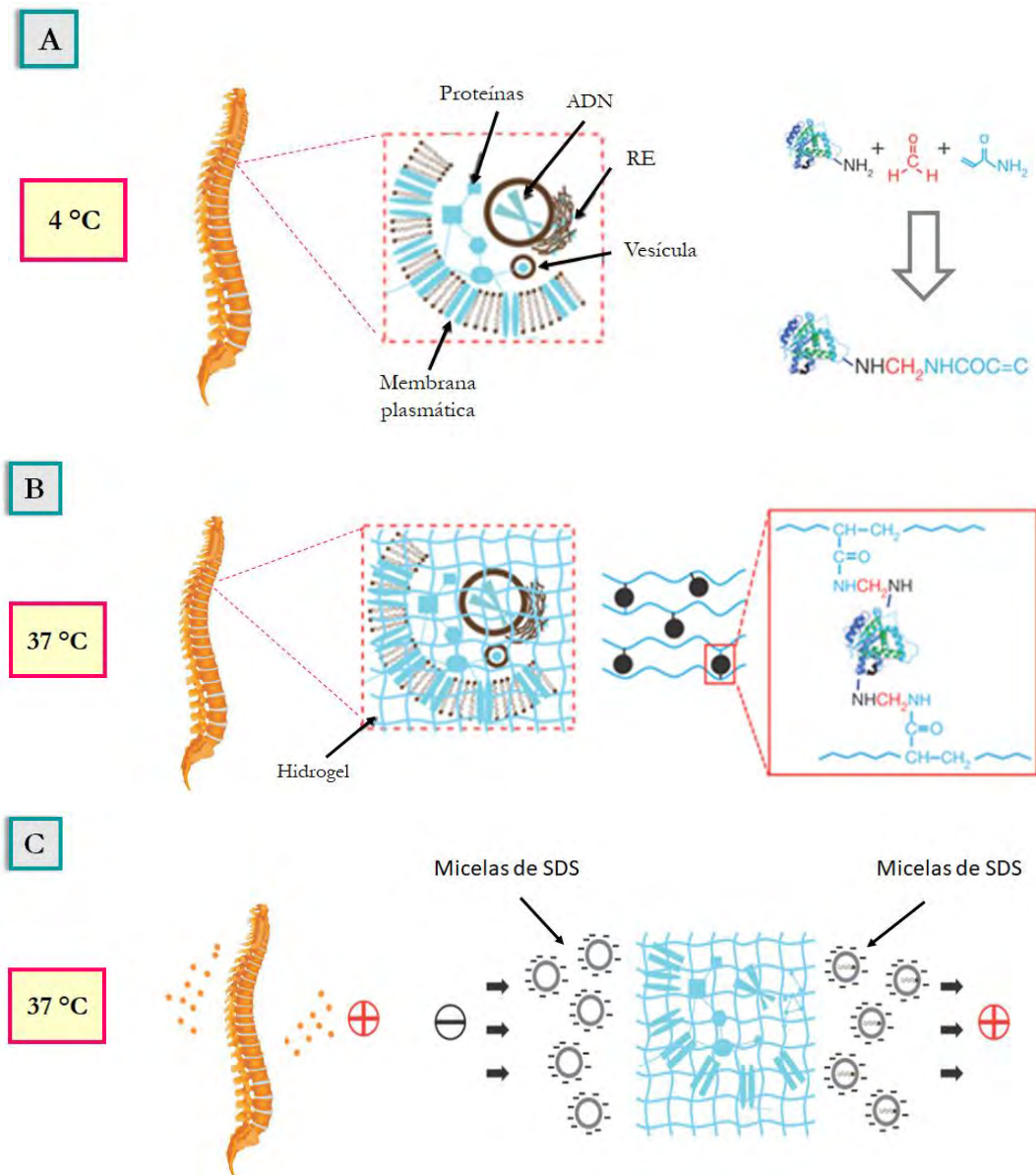


Figura 2.14. A- Incubación de la muestra con la solución hidrogel. Los monómeros de acrilamida y bis-acrilamida difunden en el tejido. B- Formación del hidrogel, activada por la temperatura. C- Proceso de clarificación. Las micelas de SDS difunden y atraviesan la muestra, arrastrando a su paso moléculas de lípido.

Para la puesta a punto de la técnica, se tomó una muestra de médula espinal intacta que había sido previamente fijada con PFA. Esta médula se colocó en un tubo Falcon de 15 ml, se cubrió completamente con la solución hidrogel (acrilamida 4 %, bis-acrilamida 0,05 %, VA 044 Initiator 0,25%, PFA 4 %, en PBS), y se incubó durante 3 días a 4 °C y al abrigo de la luz. Desde el momento de su preparación y hasta el momento de su uso, la solución de hidrogel se mantuvo a baja temperatura (0 °C - 4 °C) y al abrigo de la luz. Luego de estos 3 días, el tubo fue rellenado hasta el límite de su capacidad, con aceite comestible de cocina (Aceite de Girasol, Natura®, AGD), con el propósito de expulsar todo el O₂ que pudiera contener y evitar la inactivación del catalizador, y se lo introdujo en un baño térmico (EYELA Thermopet NTT-220, Tokyo Rikakikai Co Ltd, Japón), a 37 °C y con agitación suave, durante 3 h, para propiciar la formación del híbrido. Luego de verificar la obtención del híbrido (presencia de un gel de consistencia suficientemente firme como para permitir su manejo, pero a la vez, poroso y suave), se extrajo la médula mediante el uso de una espátula. Esta médula hibridizada se colocó en un nuevo tubo Falcon, se cubrió completamente con solución clarificante (SDS 4 %, ácido bórico 200 mM, NaOH c.s.p. pH = 8,5, en agua destilada), y se lavó en el baño agitador a 37 °C durante 48 h, con cambio de la solución clarificante a las 24 h. A continuación, se llevó a cabo la clarificación propiamente dicha, en forma pasiva (Tomer *et al.*, 2014; Zheng & Rinaman, 2015), mediante la incubación de la médula con la solución clarificante, en el baño térmico, con agitación suave y recambio de la solución cada 24 h, hasta que se observó ópticamente transparente (**Fig. 2.15**). El proceso completo se llevó a cabo durante 6 semanas. Una vez que la médula se observó transparente, se lavó en solución PBST (0,1% Tween 20 en PBS), en el baño térmico a 37 °C con agitación y durante 24 h, pasadas las cuales se renovó la solución PBST y se continuó con

el lavado durante otras 24 h. Finalmente, la médula se preservó en solución PBST a 4 °C hasta su seccionamiento y procesamiento mediante técnicas de IF.

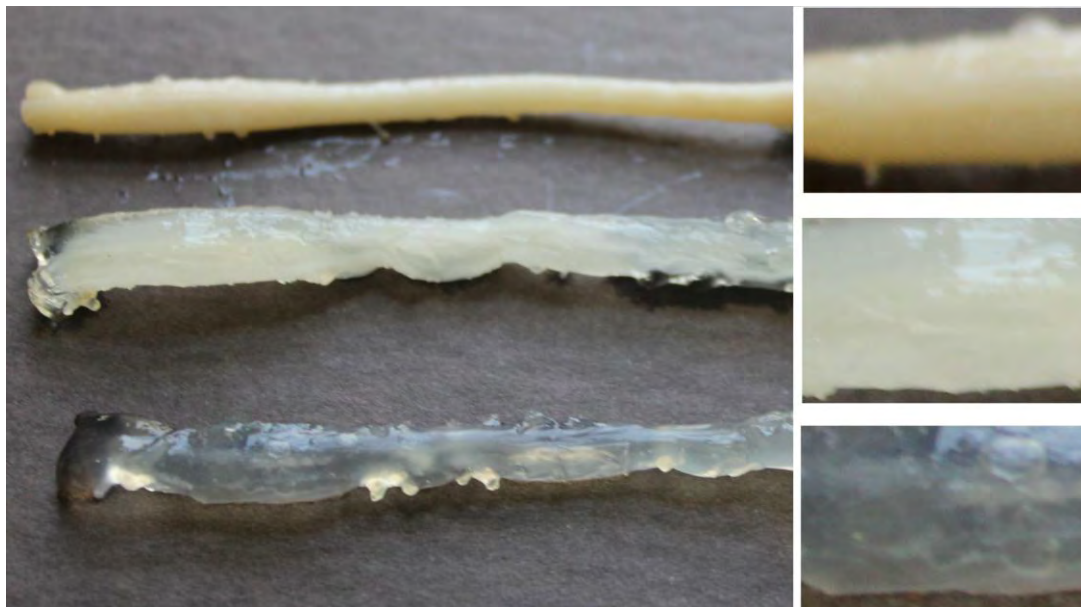


Figura 2.15. Progresión del proceso de clarificación. De arriba hacia abajo: la médula intacta, luego de 4 semanas de proceso, y luego de 6 semanas de proceso. A la derecha, se observa la magnificación de un sector correspondiente a cada una de las etapas.

La técnica puesta a punto previamente se aplicó a los segmentos cervicales C4, C5 y C6 de 3 animales experimentales (**Tabla 2.9**). En este caso, se realizó la perfusión por vía intracardíaca de los animales, con PBS en primer lugar para lavar y limpiar el sistema vascular, y a continuación con PFA 4 %. Una vez finalizada la perfusión, se realizó la necropsia y se extrajeron los órganos del sistema nervioso central. Los cerebros se preservaron en solución criopreservante, a -20 °C. Los segmentos medulares C4, C5 y C6 fueron identificados de acuerdo con lo previamente descrito (sección 2.9), seccionados por medio de una cuchilla descartable, incluidos en solución de agarosa y preservados en heladera a 4 °C durante 2 h. Posteriormente, se cortaron en rodajas de 1 mm de espesor, usando un micrótopo por vibración (vibrátomo Leica VT 1000S, Alemania). Por cada uno de los animales, las rodajas

correspondientes a cada uno de los segmentos fueron colocadas en tubos Eppendorf que contenían solución hidrogel y se los sometió al procedimiento descrito en el párrafo anterior. El proceso completo de clarificación para estos segmentos duró 2-3 semanas. Finalmente, las muestras se preservaron en solución PBST a 4 °C hasta su procesamiento mediante técnicas de IF.

Grupo	Segmento
KA1	C4
KA1	C5
KA1	C6
KA1L05	C4
KA1L05	C5
KA1L05	C6
<i>Sham</i>	C4
<i>Sham</i>	C5
<i>Sham</i>	C6

Tabla 2.9. Segmentos procesados mediante C.L.A.R.I.T.Y y animales a los que correspondían.

2.15.1 IF en muestras tratadas con CLARITY

Las muestras ya lavadas y conservadas en PBST a 4 °C se sometieron a la marcación triple con anticuerpos anti-NeuN, anti-VIM o anti-NF, anticuerpo anti-GFAP y DAPI. Durante todo el proceso, cada una de las muestras estuvo contenida en un tubo Eppendorf. Se realizó un ciclo de incubación con un anticuerpo primario durante 48 h, seguido de un lavado de 24 h con solución PBST, ambos a 37 °C y con agitación. Luego, otra incubación de 48 h de duración con el segundo anticuerpo primario y otro lavado de 24 h con PBST, a 37 °C y con agitación. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 48 h con los correspondientes anticuerpos secundarios y con DAPI a 4 °C, y durante 24 h con PBST. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y las

diluciones correspondientes se detallan en la **Tabla 2.10**. Finalmente, se preservaron las muestras en glicerol (Glicerol 87 %, Merck Química Argentina S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina) durante 24 h a 4 °C, a fin de igualar los índices de refracción, antes del montaje.

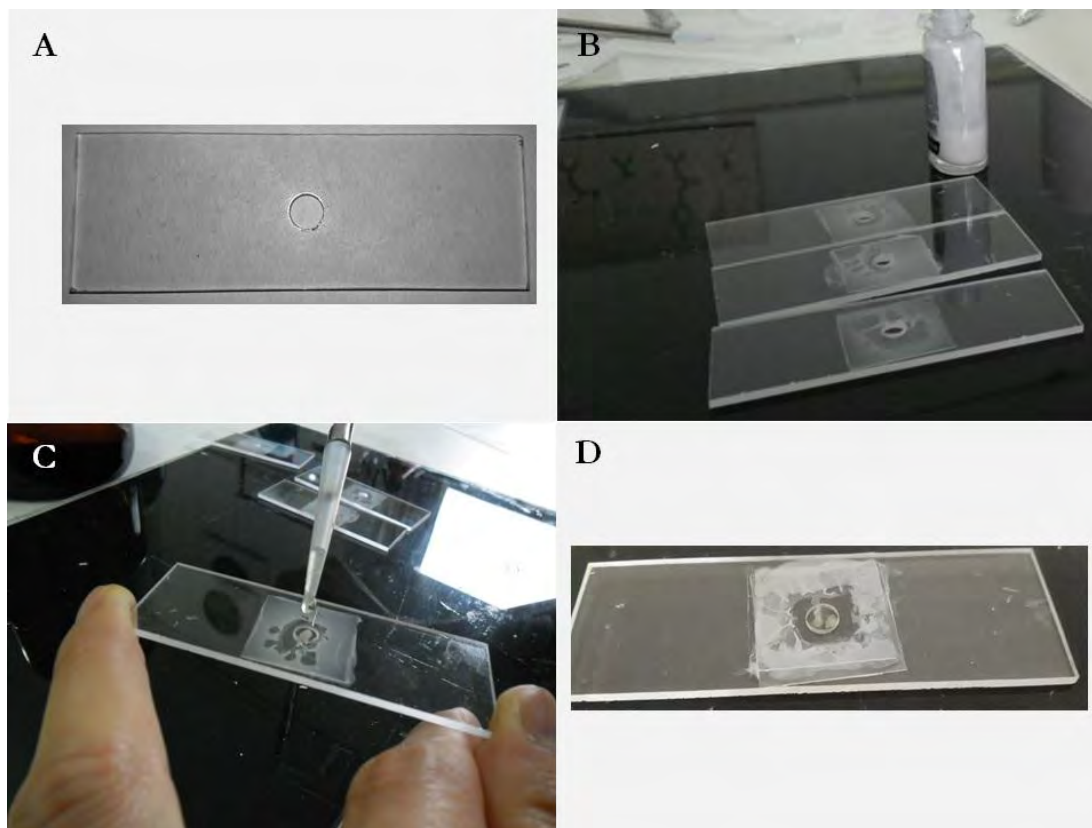


Figura 2.16. **A-** Portaobjeto de acrílico para cortes gruesos. **B-** La cara inferior de los portaobjetos fue sellada con cubreobjetos. **C-** La muestra fue colocada en el orificio y el espacio remanente fue rellenado con el medio de montaje. **D-** La cara superior del portaobjeto se cubrió con otro cubreobjeto, preparado para ser observado al microscopio confocal.

Se montaron las muestras en portaobjetos especiales de acrílico transparente, diseñado en nuestro laboratorio, de 1 mm de espesor, con un orificio destinado a albergar la muestra (**Fig. 2.16**). Sobre la cara inferior del portaobjeto se colocó, a modo de fondo, un cubreobjetos que fue adherido mediante esmalte de uñas. Una vez fijado el cubreobjetos inferior, se introdujo la muestra en el orificio

contenedor. El espacio restante se cubrió en su totalidad con glicerol, y se cubrió luego la cara superior con un cubreobjetos para permitir la observación al microscopio confocal.

Anticuerpo o Fluoróforo	Clon	Dilución	Color de emisión
GFAP	Policlonal	RTU ^a	
NeuN	Monoclonal	1:100	
NF	Monoclonal	1:100	
VIM	Monoclonal	RTU	
Alexa 488 anti-ratón	Monoclonal	1:200	Fluorescencia verde
Alexa 555 anti-conejo	Policlonal	1:200	Fluorescencia roja
DAPI		2:1000	Fluorescencia azul

Tabla 2.10. Anticuerpos y fluoróforos utilizados en muestras tratadas con CLARITY. ^a

RTU=listo para usar (del inglés, *Ready To Use*)

2.16 Análisis de imágenes

2.16.1 Captura de imágenes

Las imágenes de los diferentes cortes de estudio se capturaron mediante una cámara de video digital (Olympus DP73, Japón) montada sobre un microscopio trinocular (Olympus BX53, Japón) y conectada con una computadora que contiene los programas informáticos de análisis de imágenes digitales (cellSens Dimension (v1.7-Olympus, Japón) e ImagePro Plus v6.3 - Media Cybernetics, USA). Asimismo, se procedió a la captura de imágenes mediante un microscopio confocal (FV1000, Olympus, Japón) conectado a un software propio de adquisición. Las imágenes fueron guardadas con formato TIFF o multiTIFF, para conservar todos los detalles observados al microscopio.

2.16.2 Análisis morfométrico

Las imágenes microscópicas de los segmentos medulares, correspondientes a los diferentes grupos experimentales, coloreadas con violeta de cresilo, se analizaron morfométricamente para determinar las características celulares de las poblaciones neuronales. Los parámetros de medición utilizados fueron: área (área de la superficie de las neuronas, expresada en μm^2), diámetro (longitud promedio de los diámetros medidos a intervalos de 2 grados y que pasan por el centroide del objeto, expresado en μm), diámetro feret (distancia media entre dos planos paralelos que encierran al objeto, expresado en μm), perímetro (perímetro de las neuronas, expresado en μm) y redondez (medida de la esfericidad de las neuronas. Para objetos distintos a la esfera $E > 1$) (**Fig. 2.17**).

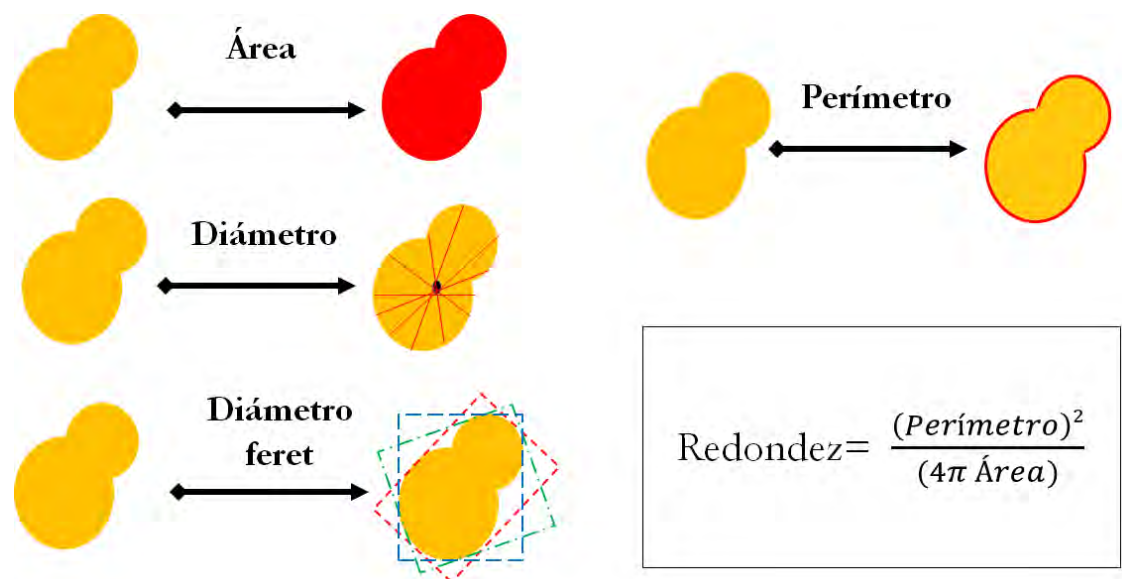


Figura 2.17. Parámetros morfométricos medidos para las poblaciones neuronales del segmento C5.

Para la representación de los datos correspondientes a los valores del área neuronal, se utilizó un gráfico de cajas y bigotes, un método útil para representar gráficamente grupos de datos numéricos a través de sus cuartiles. Los valores correspondientes al primer y tercer cuartil de la muestra conforman los límites

inferior y superior de la caja, respectivamente, mientras que el segundo cuartil (que coincide con la mediana) se grafica como una línea en el interior de la caja. Los bigotes representan los valores mínimo y máximo de todos los datos incluidos en la muestra (McGill *et al.*, 1978). Los diagramas de caja son especialmente útiles cuando la distribución de una variable es asimétrica o no sigue una distribución normal. En esos casos, interpretar una variable en función de su media o desviación estándar es un error, ya que estos estimadores no describen fielmente las características de nuestra muestra.

Los datos morfométricos de los lados ipsilateral y contralateral se consideraron por separado.

El número de neuronas por sección se estimó tomando valores de corte para los parámetros área y diámetro. Y el número de neuronas se estimó para todo el segmento utilizando la fórmula siguiente, según lo estipulado por Portiansky *et al.* (2004):

$$N = \frac{d}{n \cdot s} \sum_{i=1}^n x$$

donde,

N= número total de neuronas por segmento cervical,

d= longitud (2 mm) en el eje rostrocaudal del segmento analizado,

n= número de secciones no contiguas analizadas por segmento (n=3),

s= grosor de la sección (20 µm) y,

x= recuento del número neuronal por sección.

Las imágenes correspondientes a las muestras sometidas a la técnica IHQ e IF fueron utilizadas para la apreciación de la cantidad y distribución de los marcadores analizados.

2.17 Análisis estadístico

El análisis de medidas repetidas de un mismo animal a diferentes días (Littell *et al.*, 1998) se utilizó para la evaluación de los datos obtenidos de las pruebas de comportamiento de sensibilidad al calor y de suspensión en el aire, así como para las determinaciones de las variaciones en el peso de los animales. Todos los modelos se ajustaron con el software SAS para modelos mixtos (Proc Mixed and Proc Glimmix, SAS v.9.3; SAS Institute Inc., Cary NC, E.E.U.U). El análisis que ofreció el mejor ajuste para las tres variables incluyó los efectos fijos de los tratamientos, los términos lineales y cuadráticos (con excepción de la suspensión en el aire) para la medida del tiempo, y el valor de referencia de cada animal (al día 0) como covariable. La inclusión de valores de referencia, como el análisis de la covarianza dentro de las medidas repetidas, es el método estadístico más eficiente para tratar la variabilidad residual en animales de experimentación (Zhang X *et al.*, 2014). Las covariables de tiempo se anidaron con el tratamiento para obtener una curva estimada usando los datos de todos los animales para un tratamiento dado. Las diferencias entre los efectos de los tratamientos en un día dado se estimaron como contrastes lineales (Searle, 1971), siempre que la prueba para los tratamientos con grados de libertad corregidos por el procedimiento de Kenward & Roger (1997), consideró que la prueba correspondiente era significativa ($P < 0.05$). Por lo tanto, las figuras a la ganancia de peso y a las pruebas de comportamiento representan la evolución estimada de la respuesta media del tratamiento a lo largo de los tiempos, para la variable de respuesta correspondiente.

Para la prueba de sensibilidad al calor correspondiente a la etapa 1, se evaluó en primer lugar, si la variable tiempo de latencia (I) cumplía con los criterios de normalidad y se encontró que la distribución estaba sesgada hacia la derecha (frecuencia más alta de valores más grandes). Por lo tanto, se usó la variable

$T^* = \ln(T)$ para construir las estimaciones del modelo y probar las hipótesis. El modelo que mejor se ajustó a los datos fue un análisis de covarianza heterogénea con los tratamientos como una variable de clasificación y el tiempo (t, en días) como covariable anidada dentro de los tratamientos, mientras que la varianza resultó ser heterogénea debido a los tratamientos.

El análisis de la prueba Desplazamiento en Escalera Horizontal se llevó a cabo en 2 etapas siguiendo el procedimiento planteado por Fletcher *et al.* (2005), ya que un tercio de los datos registrados fueron ceros. En la primera etapa, la prueba se tomó como una variable de Bernoulli codificando los valores distintos de cero como 1, mientras que los ceros se mantuvieron como tales. La segunda etapa consideró solo los valores distintos de cero de la prueba. Los ceros se tomaron como datos faltantes (Fletcher *et al.*, 2005). La heterogeneidad de la varianza motivó un cambio en el nivel de significancia de la prueba F corregida para esta variable de 0,05 a 0,10, porque las diferencias encontradas entre los tratamientos fueron biológicamente significativas. Los modelos gaussianos se ajustaron con Proc Mixed y la prueba binomial de caminata en la escalera horizontal con Proc Glimmix.

Para todos los análisis restantes el análisis de varianza (ANOVA) fue utilizado para determinar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados. Para las múltiples comparaciones se utilizó el test de Holm Sidak. Aquellos datos con distribución no normal fueron analizados mediante el uso del test estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis y las múltiples comparaciones se llevaron a cabo mediante el test de Dunn. El límite de significación se estableció en $P < 0,05$.

Estos análisis, así como todos los gráficos presentados (con excepción de los gráficos de distribución porcentual de la marca de NF, que fueron realizados con el programa Microsoft Excel 2016), se llevaron a cabo utilizando el

programa específico *GraphPad Prism* versión 6.00 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com).

Resultados y Discusión

Es mejor saber después de haber
pensado y discutido que aceptar los
saberes que nadie discute para no
tener que pensar.

Fernando Savater.
Filósofo español

3. RESULTADOS

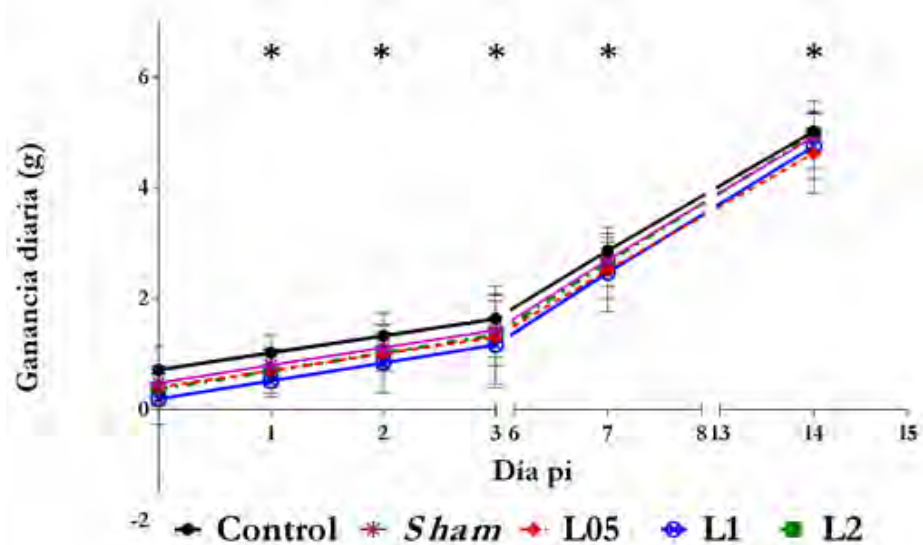
3.1. ETAPA 1. Inyección intraparenquimatosa de las diferentes concentraciones de lidocaína

3.1.1. Evaluación clínica. Estado general y comportamiento motriz

Durante la cirugía, los animales de los grupos control, *sham*, L05, L1, y L2 no exhibieron ningún signo de tipo nervioso. Las ratas se recuperaron de la anestesia alrededor de 40-90 min después de la cirugía. Al despertar, los animales no mostraron ningún tipo de signo distintivo. En todos los casos, todos los animales apoyaban el miembro ipsilateral, el cual era funcional, aunque en ciertas ocasiones, durante los tiempos de reposo, los animales experimentales (L05, L1 y L2) lo mantenían suspendido durante un tiempo. Los animales inyectados con cualquiera de las concentraciones de lidocaína y los de los grupos *sham* y control no exhibieron decaimiento ni pérdida de apetito o locomoción, más allá del tiempo requerido para la recuperación post-anestésica (40-90 min).

3.1.2. Evaluación del peso

Los animales inyectados con cualquiera de las concentraciones de lidocaína, así como los animales *sham* y control no mostraron reducción de su peso corporal a lo largo del experimento (**Fig. 3.1**). A partir de la inyección y hacia el día 14, todos los grupos mostraron ganancia de peso, hallándose diferencias significativas entre los diferentes grupos para los diferentes días. El grupo control tuvo la mayor ganancia de peso a lo largo del experimento, aunque la tendencia fue similar para todos los grupos.



*	1	2	3	7	14
Control (£)	# p<0,0130 & p<0,0001 \$ p<0,0001 % p=0,0002	# p=0,0115 & p<0,0001 \$ p<0,0001 % p=0,0002	# p=0,0122 & p<0,0001 \$ p<0,0001 % p=0,0002	& p<0,0001 \$ p=0,0001 % p=0,0122	& p=0,0050
Sham (#)	& p<0,0001 \$ p=0,0005	\$ p=0,0003	& p=0,0445 \$ p=0,0003	& p=0,0338 \$ p=0,0244	
L05 (&)	\$ p=0,0024	\$ p=0,0044	\$ p=0,0145		% p=0,0428
L1 (\$)	% p=0,0184	% p=0,0101	% p=0,0075	% p=0,0452	

%=L2

Figura 3.1. Evaluación del peso corporal. Arriba: Ganancia de peso a lo largo del experimento. Abajo: Tabla de diferencias significativas de acuerdo con el análisis de medidas repetidas. Los datos se expresan como Media \pm SEM. * $P<0,05$.

3.1.3. Pruebas de comportamiento

3.1.3.1. Sensibilidad al calor

No se detectaron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los días pi analizados (**Fig. 3.2**). Aunque las LSM estimadas sugieren un aumento de T^* a lo largo del tiempo para todos los tratamientos; no se observaron diferencias intragrupo. Cabe señalar que la **Fig. 3.2** muestra las LSM estimadas para la variable transformada analizada con el modelo estadístico seleccionado, y no el tiempo real (expresado en segundos) registrado para cada grupo.

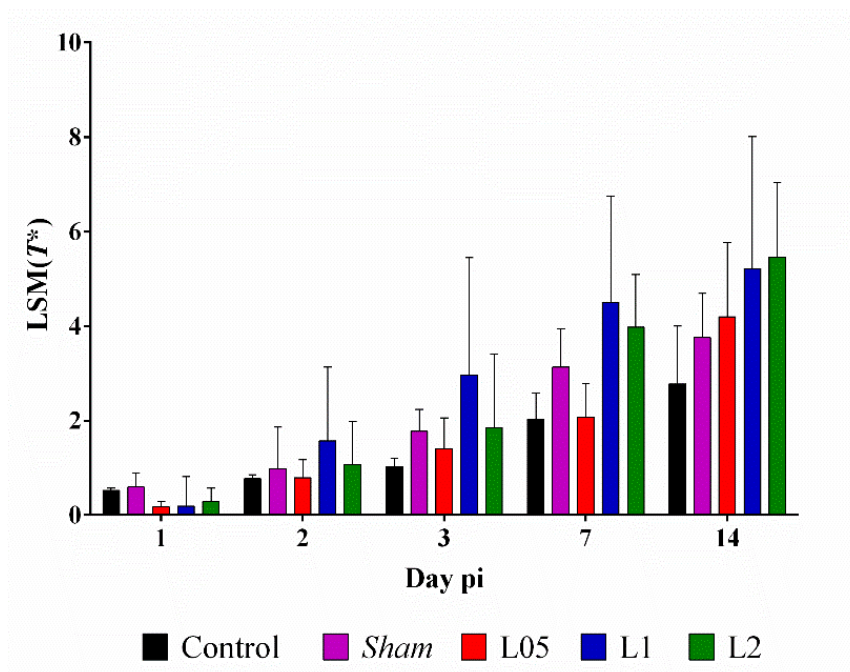


Figura 3.2. Prueba de sensibilidad al calor. Arriba: Tiempo de latencia (en seg) en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se expresan como LSM (T^*) \pm SEM. * $P < 0,05$.

3.1.3.2. Suspensión en el aire

Se hallaron diferencias significativas entre los tiempos de suspensión para los diferentes grupos experimentales al considerar los días 1, 2, 3 y 7 pi (**Fig. 3.3**). El grupo control mostró el mayor tiempo de suspensión entre los días 1 a 7, siendo éste significativamente mayor con respecto al grupo *sham*, para los días 1, 2 y 3 pi; con respecto al grupo L05, para los días 1, 2, 3 y 7 pi y con respecto al grupo L1, para los días 1 y 2 pi. El grupo *sham* mostró un tiempo de suspensión significativamente diferente con respecto al grupo L05 para el día 1 pi, y con respecto a los grupos L1 y L2 para los días 1, 2 y 3 pi. El grupo L05 fue significativamente diferente de los grupos L1 y L2 para los días 1, 2, y 3 pi.

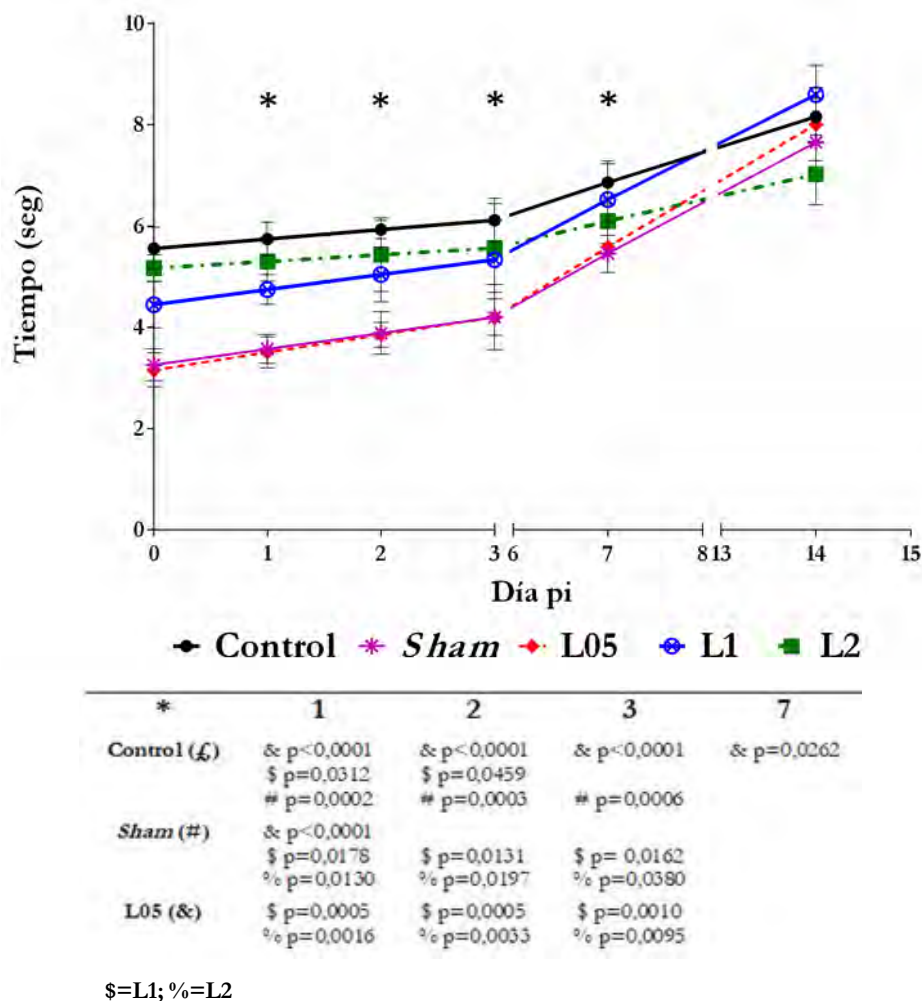


Figura 3.3. Prueba de suspensión en el aire. Arriba: Tiempo de suspensión (seg) en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas de acuerdo con el análisis de medidas repetidas. Los datos se expresan como Media \pm SEM. *P<0,05.

3.1.3.3. Desplazamiento en escalera horizontal

Para cada grupo se graficó la cantidad total de pasos, para cada día pi (**Fig. 3.4**). Se observó que los grupos L1 y L2 redujeron su cantidad de pasos a partir del día 1 pi pero, a diferencia del grupo L1, el grupo L2 recuperó su cantidad de pasos al día 14 pi. El grupo L05 mantuvo aproximadamente su cantidad de pasos en los días 1, 2 y 3 pi, con un leve incremento en el día 7 pi.

Los pasos de cada grupo se desglosaron en las diferentes categorías propuestas por Metz y Whishaw (2002) y previamente detalladas (sección 2.7.2.2), para cada uno de los días pi (**Fig. 3.5**). Para ambos miembros, ipsilateral y contralateral, y en todos los días pi, se observó que la mayor cantidad de pasos correspondieron a la categoría 6, para todos los grupos. También, para todos los días pi y en ambos miembros, las demás categorías que registraron mayor cantidad de pasos fueron las 3, 4 y 5. El grupo L1, además, registró pasos en las categorías 2 y 1 para el miembro ipsilateral, en los días 2, 3 y 14 pi, respectivamente.

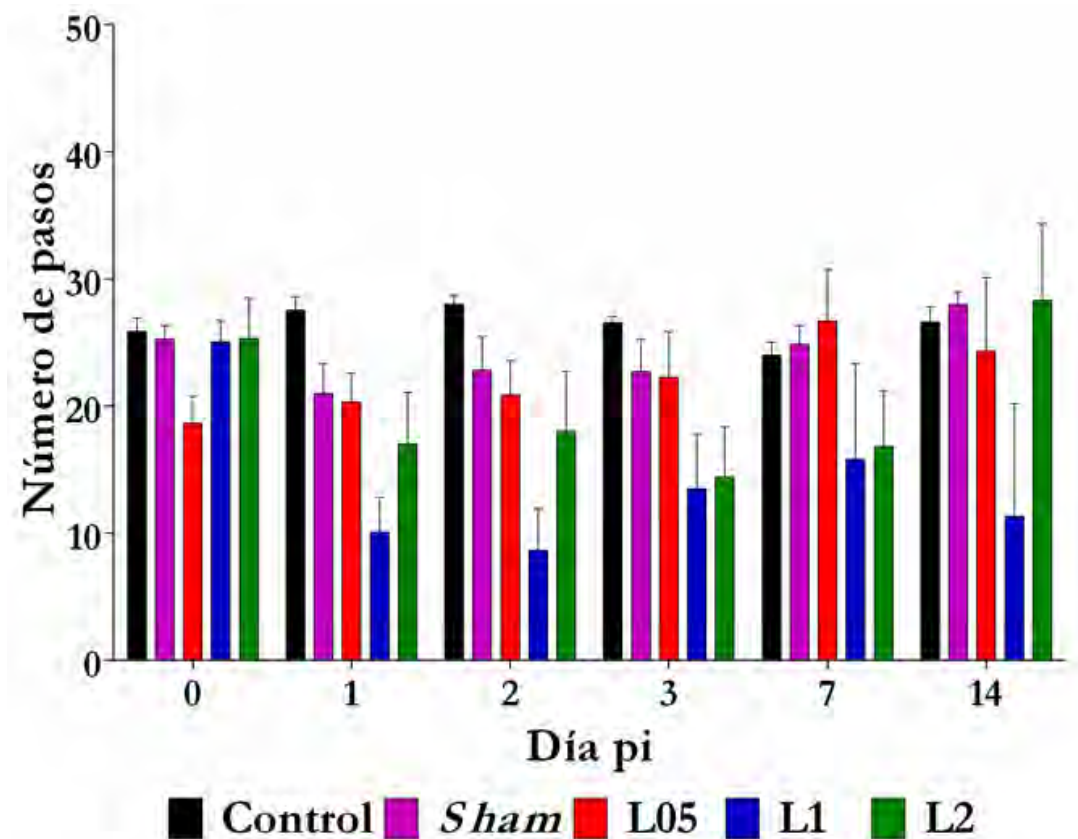


Figura 3.4. Cantidad promedio de pasos totales por grupo en función del día pi. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

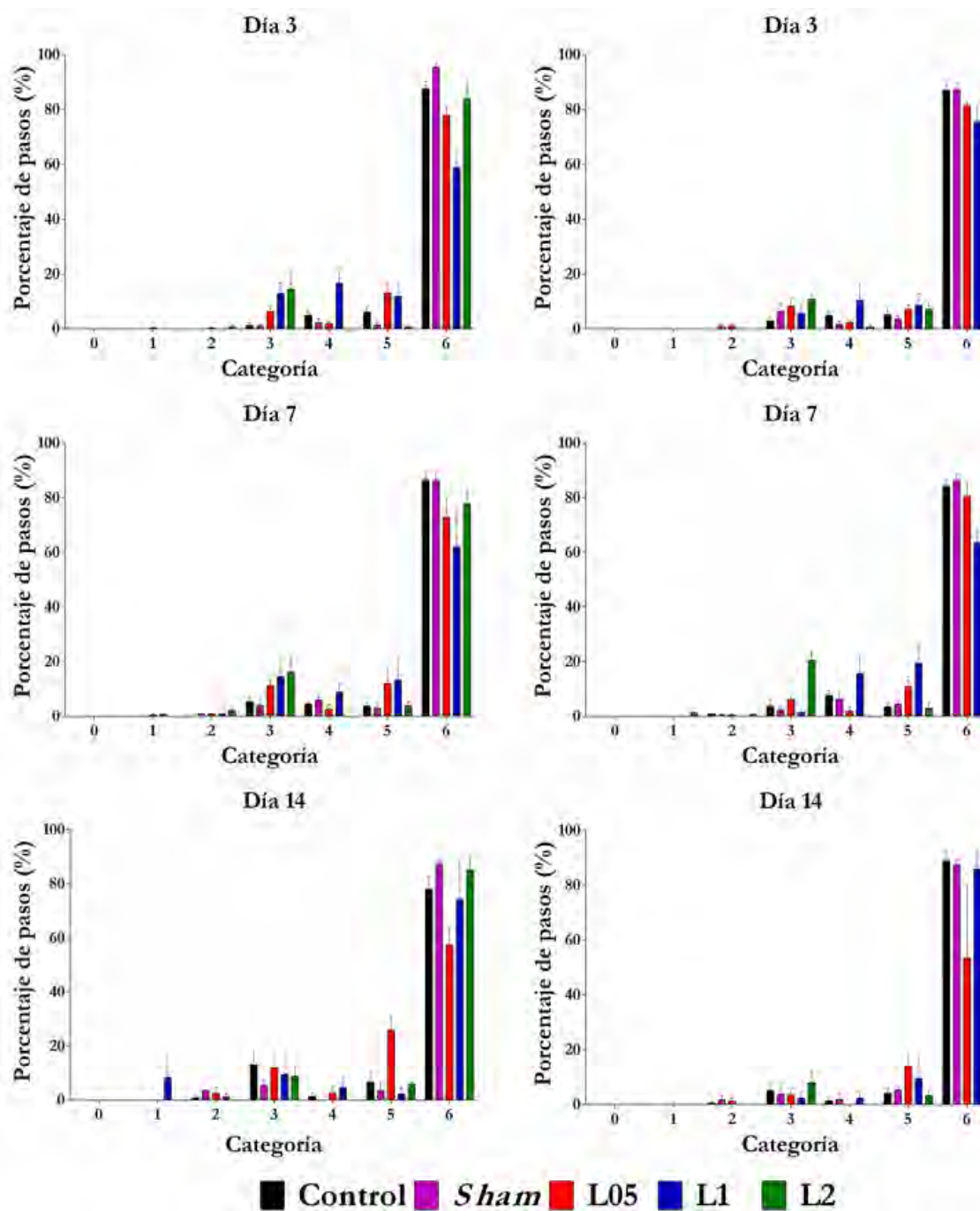


Figura 3.5. (continuación). Cantidad de pasos desglosados por categoría (según Metz y Whishaw, 2002). Los pasos de cada categoría se expresan como porcentaje del total de pasos para cada grupo y por día pi. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

En síntesis, se encontró un porcentaje muy pequeño de errores ($\sim 0-1\%$) para los diferentes grupos, durante todo el experimento, con excepción del grupo L1 del lado ipsilateral (**Fig. 3.6**), que mostró diferencias significativas entre su

número de errores (expresado como porcentaje) con respecto a los demás grupos. El grupo *sham*, asimismo, mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. Para el miembro contralateral, el grupo L2 mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. De acuerdo con lo expuesto en la sección 2.16, para esta prueba el límite de significación fue $P < 0,10$.

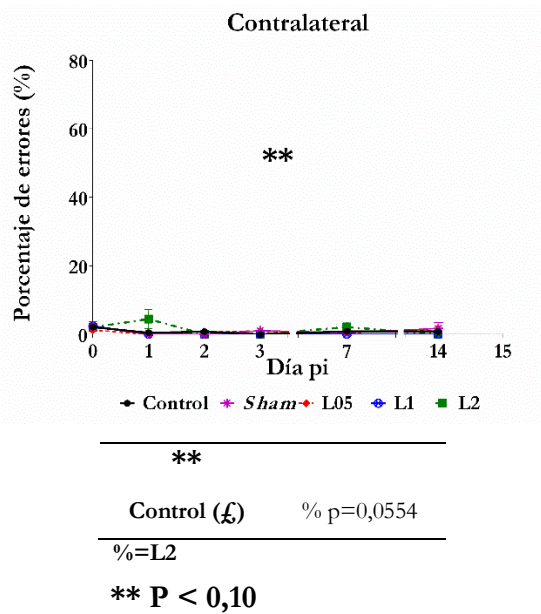
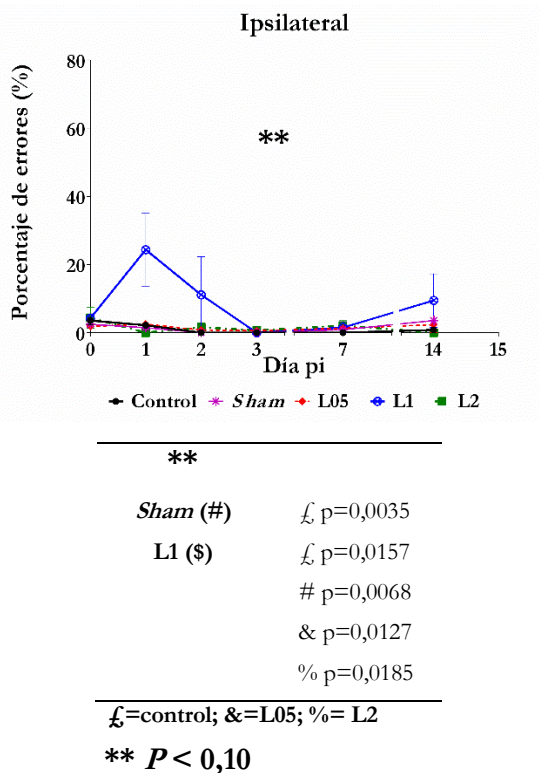


Figura 3.6. -Izquierda. Arriba: Gráfico de porcentaje de errores en función de días pi, para el miembro ipsilateral. **Abajo:** Tablas de significancias. Datos expresados como Media \pm SEM, $**P < 0,10$.

-Derecha. Arriba: Gráfico de porcentaje de errores en función de días pi, para el miembro contralateral. **Abajo:** Tablas de significancias. Datos expresados como Media \pm SEM, $**P < 0,10$.

3.1.2. Histoquímica

Las secciones cervicales correspondientes al grupo control no mostraron alteraciones del tejido. Las secciones de la médula espinal de los animales *sham*

e inyectados con lidocaína (L05, L1 y L2) mostraron algunas infiltraciones de células polimorfonucleares y áreas hemorrágicas menores en el sitio de la inyección. Este patrón se correspondió con el punto de penetración y la trayectoria de la aguja de inyección, como fuera descrito previamente por Nishida et al. (2015). Las secciones del grupo *sham* mostraron unas pocas neuronas tumefactas en sectores relativamente cercanos al punto de entrada de la aguja (desde la Lámina IV hasta la Lámina VI).

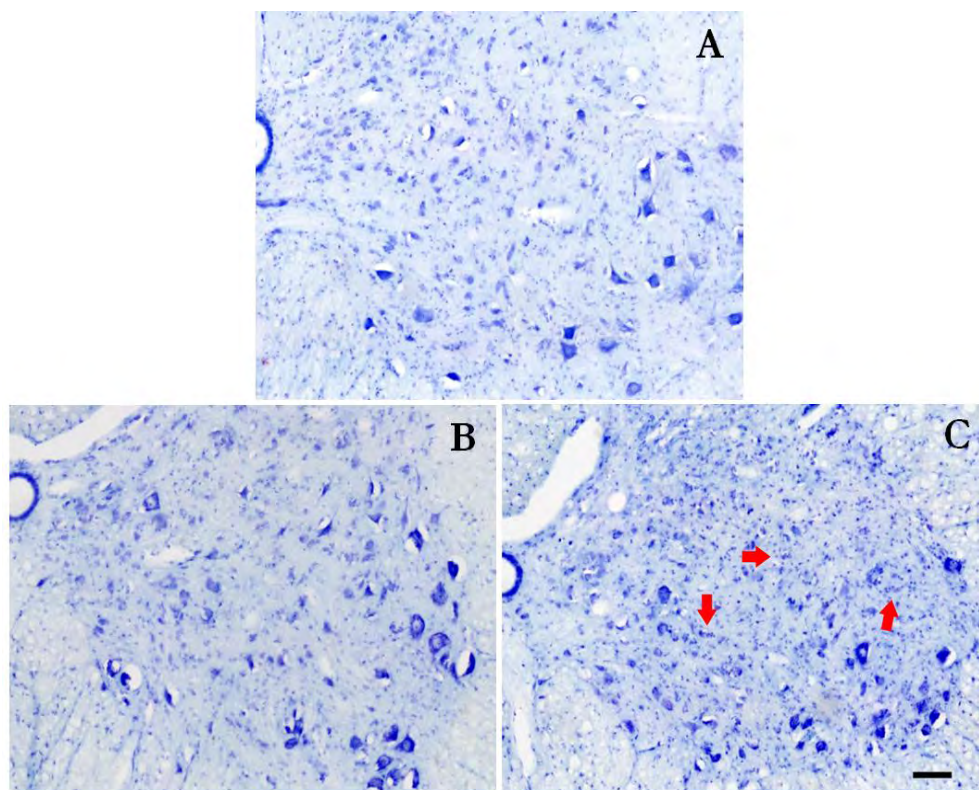


Figura 3.7. Aspecto histológico de secciones del segmento C5 pertenecientes a los grupos L05 (A), L1 (B) y L2 (C) que muestra la distribución y el aspecto de las neuronas para el día 3 pi. Se observa retracción de varias neuronas en el grupo al que se le inyectó lidocaína al 1 % (B) y al 2 % (C). Se puede observar una reducción en el número de neuronas y un aumento en la reactividad glial (C). Se puede ver satelitosis glial alrededor de las neuronas degeneradas (flechas). Barra = 100 μ m.

Si bien las neuronas de las secciones correspondientes a los grupos inyectados con lidocaína (L05, L1, L2) mostraron un aspecto similar al observado en el grupo *sham* para el lado ipsilateral (**Fig. 3.7**), se observó una mayor tumefacción

de las neuronas a medida que la concentración de lidocaína aumentaba. Además, se observaron eventos de satelitosis de células gliales en el lado ipsilateral de las secciones correspondientes a los animales del grupo L2. Se observó, además, que en los grupos L2 y L1, la infiltración celular a causa de la inyección de lidocaína era más extensa en comparación con la de los animales del grupo L05.

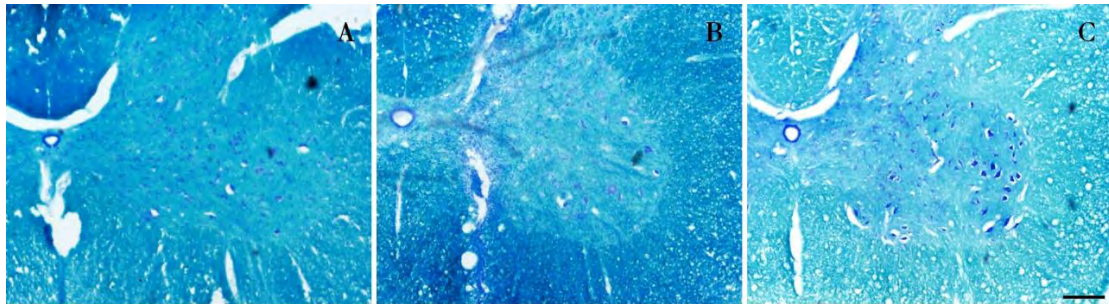


Figura 3.8. Identificación de mielina usando doble tinción con *Luxol Fast Blue* y violeta de cresilo. Se muestran las regiones ventrales ipsilaterales de los grupos control (A), *sham* (B) y L05 (C). Todas las imágenes corresponden al día 7 pi. Barra = 200 μ m.

3.1.2.1. Identificación de mielina mediante *Luxol Fast Blue*

Los animales del grupo control mostraron tinción de las fibras dorsales y ventrales en tono azul-verdoso, mientras que las neuronas se tiñeron de violeta. Las sustancias blanca y gris se diferenciaron entre sí y la coloración fue homogénea en cada una de ellas (**Fig. 3.8**). Los animales de los grupos *sham*, L05, L1 y L2 mostraron un aspecto de tinción similar, sin alteraciones respecto de lo observado para el grupo control.

3.1.3. Inmunohistoquímica

3.1.3.1. Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN

En las secciones correspondientes al grupo control, fue posible identificar las neuronas en toda la sustancia gris, identificándose núcleos y somas (**Fig. 3.9**).

Para los grupos sham, L05, L1 y L2 se observó una intensidad de marcación similar a la observada en el grupo control.

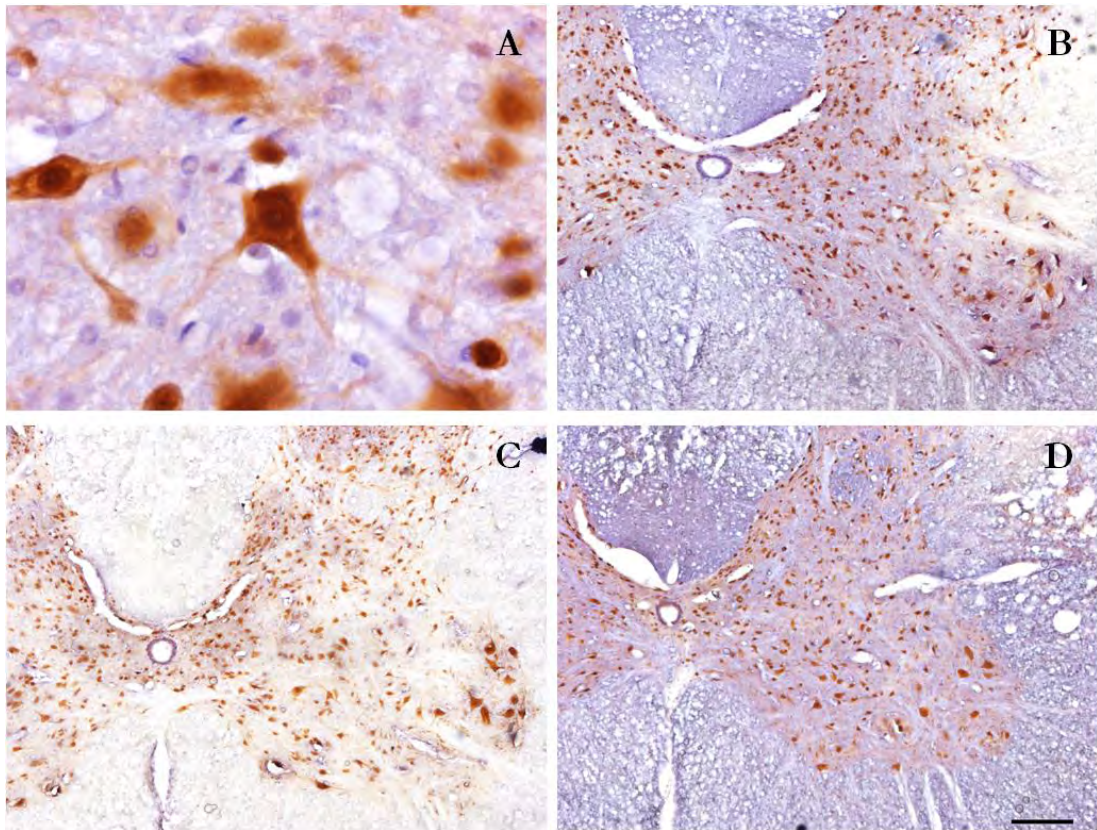


Figura 3.9. Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN. Se muestran neuronas pertenecientes al grupo control marcadas con el anticuerpo anti-NeuN (A); y secciones de las regiones ipsilaterales correspondientes a los grupos L05 (B), L1 (C) y, L2 (D); para los 7 días pi. Barra = 200 μ m.

3.1.3.2. Identificación y determinación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP

La tinción con el anticuerpo anti-GFAP permitió observar, en el grupo control, y para ambos lados de las secciones del segmento C5 de la médula espinal, la presencia de astrocitos distribuidos por toda la sección medular, con mayor abundancia en la sustancia gris con respecto a la blanca (**Fig. 3.10**). Para el

grupo *sham*, las células observadas fueron de mayor tamaño y con prolongaciones más largas con respecto a los demás grupos.

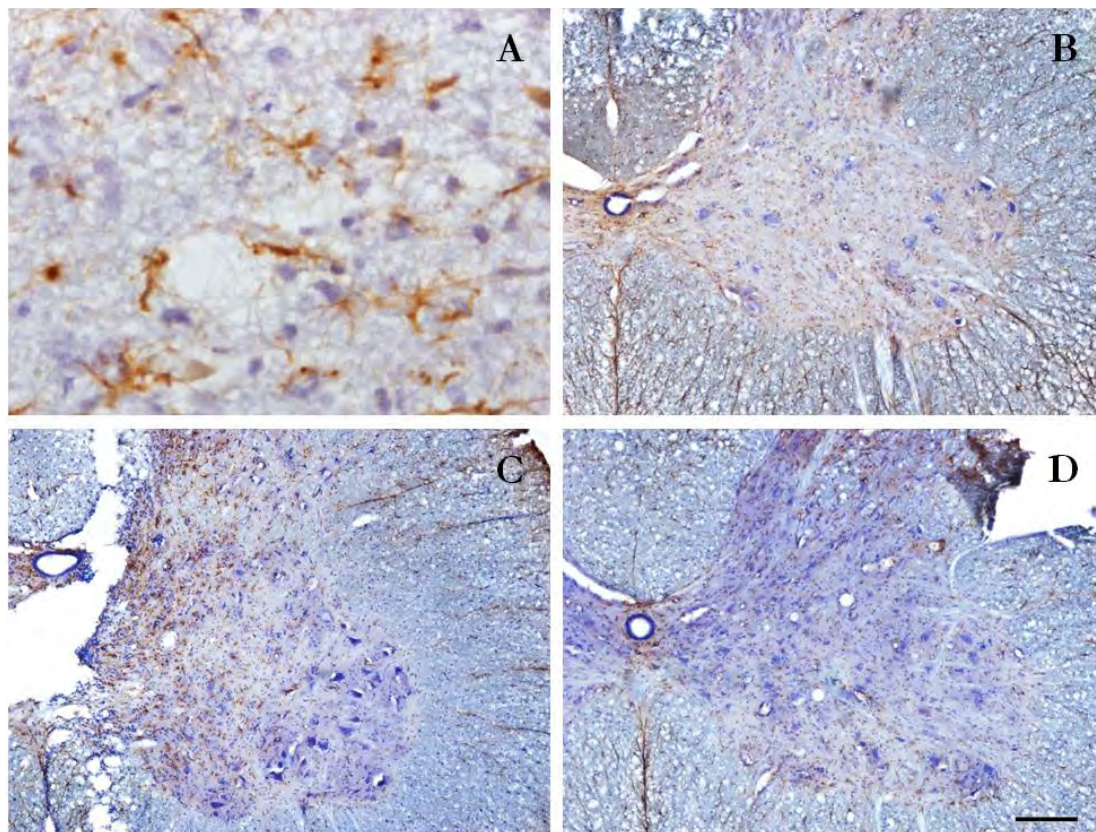


Figura 3.10. Identificación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP. - Se muestran astrocitos marcados con el anticuerpo anti-GFAP (**A**) y secciones de las regiones ipsilaterales del grupo control (**B**), *sham* (**C**) y L05 (**D**), a los 3 días pi. Barra = 200 μ m.

El área inmunomarcada con GFAP fue significativamente mayor para los animales del grupo *sham* en comparación con los grupos inyectados con lidocaína y el grupo control para el día 1 pi ($P = 0,0083$ ipsilateral, $P = 0,0066$ contralateral) (**Fig. 3.11**).

En el día 3 pi, los animales del grupo *sham* mostraron un área inmunomarcada significativamente mayor en comparación con los grupos inyectados con lidocaína ($P = 0,0025$ ipsilateral, $P = 0,0025$ contralateral). Para el día 7 pi, los animales del grupo *sham* redujeron su área inmunomarcada, pero ésta aún fue significativamente mayor en comparación con los grupos L2 y L1 ($P = 0.0010$

ipsilateral, $P = 0.0021$ contralateral). Los animales del grupo control mostraron un área inmunomarcada significativamente mayor cuando se compararon con los animales del grupo L1 al día 7 pi ($P = 0.0010$ ipsilateral, $P = 0.0021$ contralateral) y al día 14 pi ($P = 0.0103$ ipsilateral, $P = 0.0288$ contralateral).

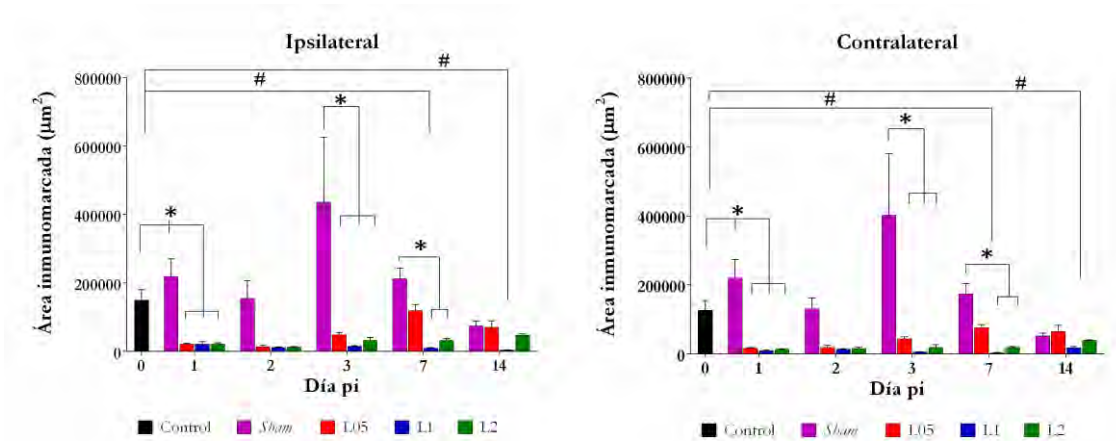


Figura 3.11. Área inmunomarcada con GFAP para los diferentes grupos en función del tiempo, para las hemimédulas ipsilateral y contralateral. * sham vs. otros grupos; # control vs. L1. Los datos se expresan como Media \pm SEM; * $\#P < 0,50$.

3.1.3.3. Identificación y determinación de neurofilamentos mediante el anticuerpo anti-NF

La tinción con NF en el grupo control fue similar para ambas hemimédulas, con la marca principalmente distribuida en la sustancia blanca (**Fig. 3.12**).

Para todos los grupos, la marcación con NF en la sustancia blanca se evidenció en forma de estructuras circulares, correspondientes a la sección transversal de los axones, mientras que en la sustancia gris se evidenció en forma de filamentos longitudinales. Además, en el día 1 pi se observó marcación en el soma de neuronas, en las secciones transversales correspondientes al grupo L1, en ambas hemimédulas.

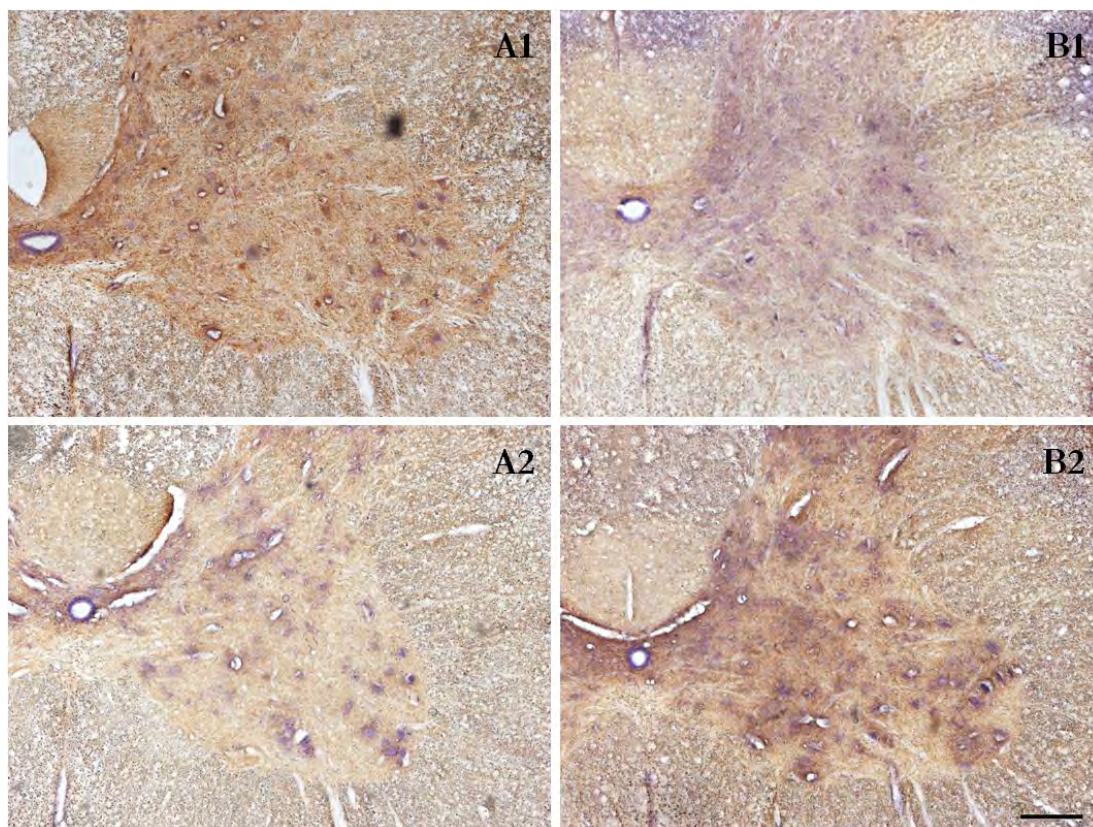


Figura 3.12. Identificación de neurofilamentos (NF). **A1** y **B1**- Secciones ipsilaterales del grupo L1 para los días 1 y 14 pi, respectivamente. **A2** y **B2**- Secciones ipsilaterales del grupo L2 para los días 1 y 14 pi, respectivamente. Barra: 200 μ m.

Los porcentajes de área inmunomarcada en las sustancias gris y blanca, respecto de las respectivas áreas totales, fueron graficados para cada hemimédula a los días 1 y 14 pi (**Fig. 3.13**). En la hemimédula ipsilateral y al día 1 pi, se observó un incremento en la marca registrada en la sustancia gris de todos los grupos, con respecto al grupo control. Dicho incremento se revirtió hacia el día 14 pi. En cuanto a la sustancia blanca, los grupos *sham*, L1 y L2 redujeron su área inmunomarcada hacia el día 14 pi, mientras que el grupo L05 incrementó su marca en esta sustancia con respecto a la observada para el día 1 pi.

En el lado contralateral, los grupos *sham*, L05 y L1 incrementaron su marca en sustancia gris hacia el día 14 pi, mientras que el grupo L2 la redujo. Para la sustancia blanca se observó un patrón similar al de la hemimédula ipsilateral.

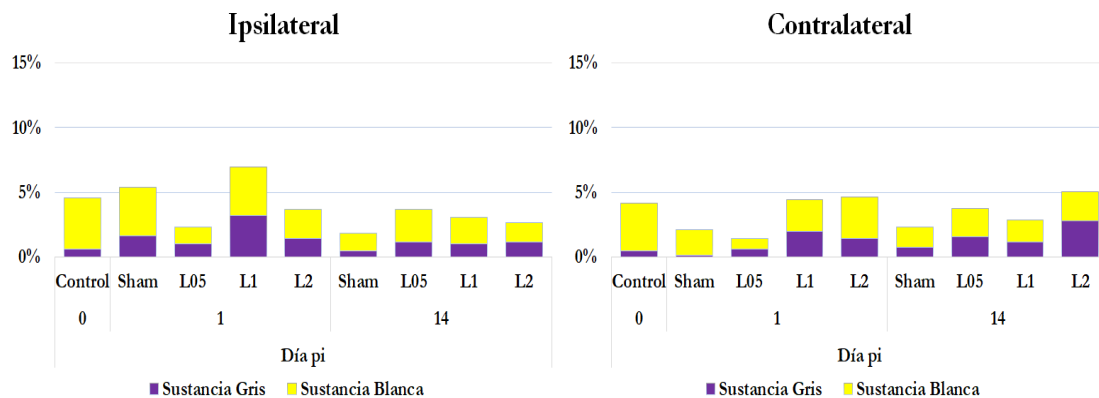


Figura 3.13. Distribución porcentual de la marca de NF en secciones del segmento C5 para los grupos control, *sham*, L05, L1 y L2. El área positiva para NF en las sustancias gris y blanca, se expresa como porcentaje del área total en cada hemimédula.

3.1.4. Inmunofluorescencia

3.1.4.1. GFAP+PCNA

Las muestras correspondientes al grupo control exhibieron marca positiva para GFAP en toda la sección medular y marca positiva para PCNA en la región del epéndimo (**Fig. 3.14**). Esta distribución de marca se observó también para las secciones correspondientes a los grupos inyectados con lidocaína. En las secciones correspondientes al grupo *sham*, se observó una mayor proporción de astrocitos, con ramificaciones más notorias en comparación con los demás grupos. Además, para el grupo *sham* se observó marca positiva para PCNA más allá de la zona del epéndimo, en células positivas para GFAP.

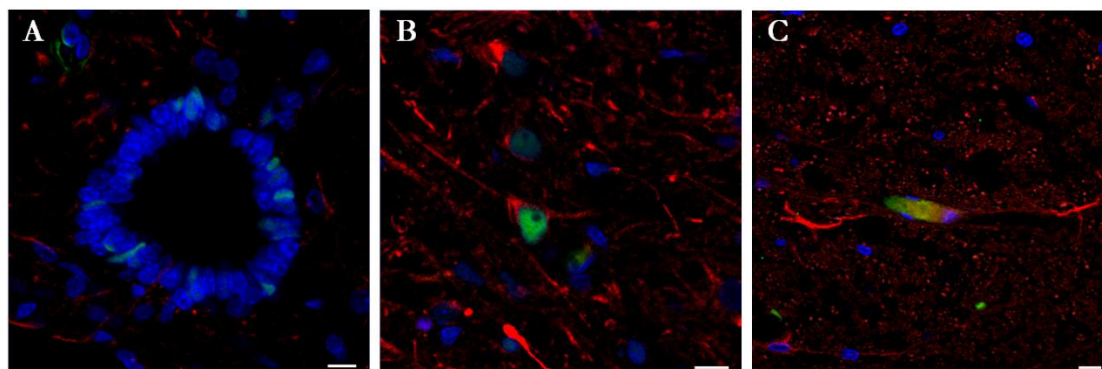


Figura 3.14. A- Se muestra el epéndimo de una sección correspondiente al grupo control, donde se aprecian células positivas a PCNA, y células positivas a GFAP en los alrededores. B- Sección de una hemimédula ipsilateral correspondiente al grupo *sham*, al día 3 pi, donde se observan numerosos astrocitos, de los cuales algunos expresan también PCNA. C- Detalle de un astrocito correspondiente al grupo *sham* a los 3 días pi, donde se aprecia la co-localización para ambos anticuerpos. Barra: 10 μ m.

3.1.4.2. Fluoro-Jade B

Las muestras procesadas con la tinción de Fluoro-Jade B permitieron evidenciar la presencia de células positivas en la hemimédula ipsilateral de los grupos L1 y L2, en ambos casos al día 3 pi. En el grupo L1, se hallaron escasas células positivas en la región ventral (**Fig. 3.15**), mientras que en el grupo L2 fueron más abundantes y se hallaron en las regiones media y ventral (**Fig. 3.16**). No se evidenciaron células positivas al reactivo en las secciones de los grupos control, *sham* y L05 para ninguno de los días pi.

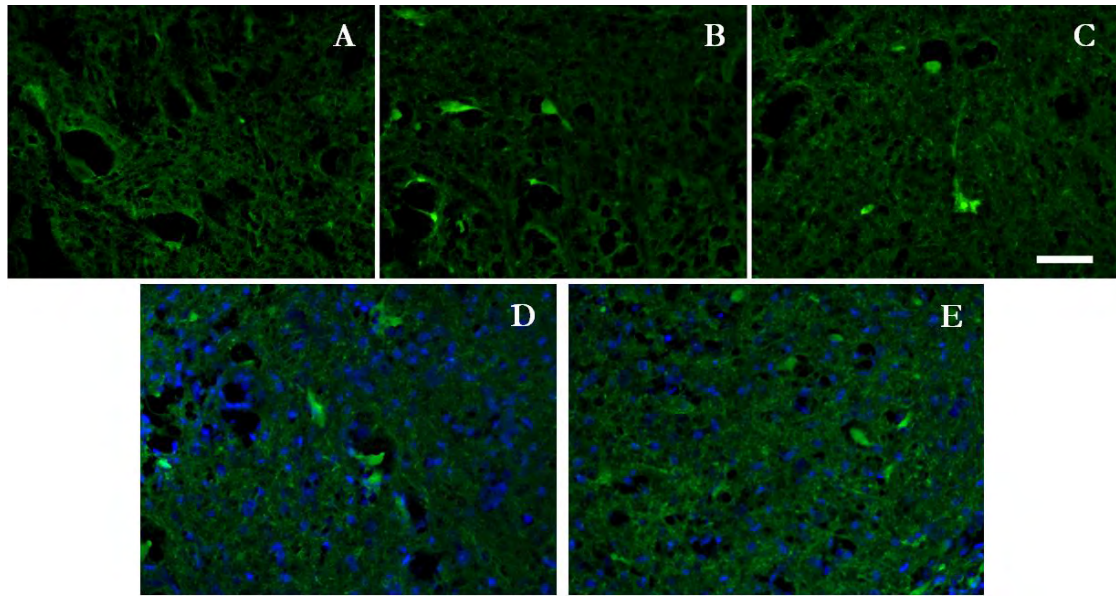


Figura 3.15. Secciones del grupo L1 procesadas con la tinción con Fluoro-Jade B. Imagen de un sector de la hemimédula contralateral (**A**) y de sectores de la región ventral de la hemimédula ipsilateral (**B** y **C**), donde se evidencia la presencia de células en degeneración en el grupo L1 al día 3 pi. Imágenes de dos sectores de la región ventral de secciones del grupo L1 (**D** y **E**), procesadas con la tinción de Fluoro-Jade B y DAPI. Barra: 50 μ m.

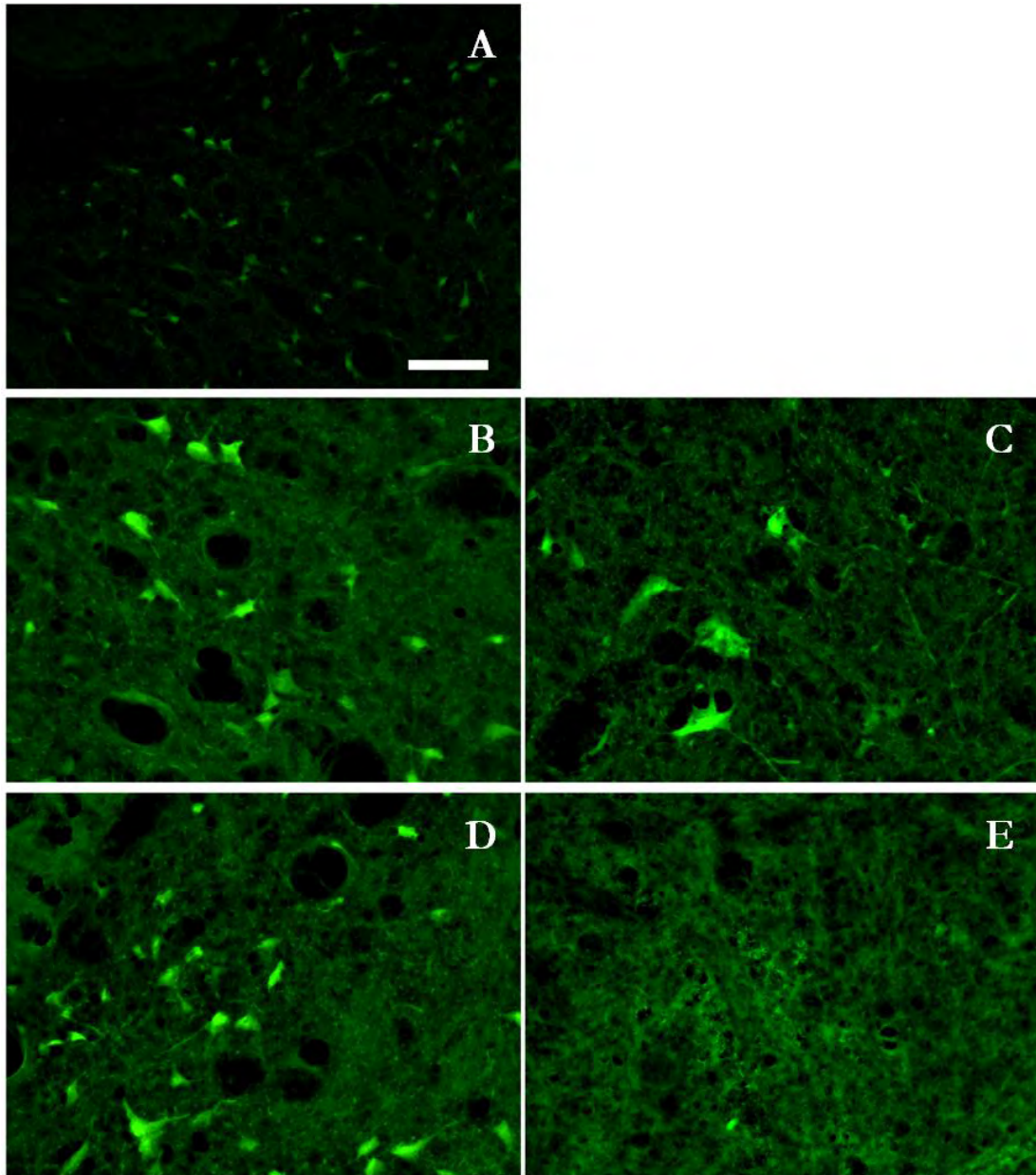


Figura 3.16. Secciones del grupo L2 procesadas con la tinción con Fluoro-Jade B. Imágenes de la región media ipsilateral (**A**, Barra: 100 μm ; **B**, Barra: 50 μm); de la región ventral ipsilateral (**C** y **D**, Barra: 50 μm); y de la hemimédula contralateral (**E**, Barra: 50 μm).

3.1.5. Análisis Morfométrico

La comparación de las áreas de las hemimédulas en las secciones transversales del segmento C5 mostró un aumento significativo del área ipsilateral de los

animales del grupo L2 con respecto al grupo control para los días 1 y 2 pi ($P = 0.0458$ y $P = 0.0020$, respectivamente) (**Fig. 3.17**). No se observaron diferencias significativas entre las áreas de las secciones contralaterales de los grupos a lo largo del experimento.

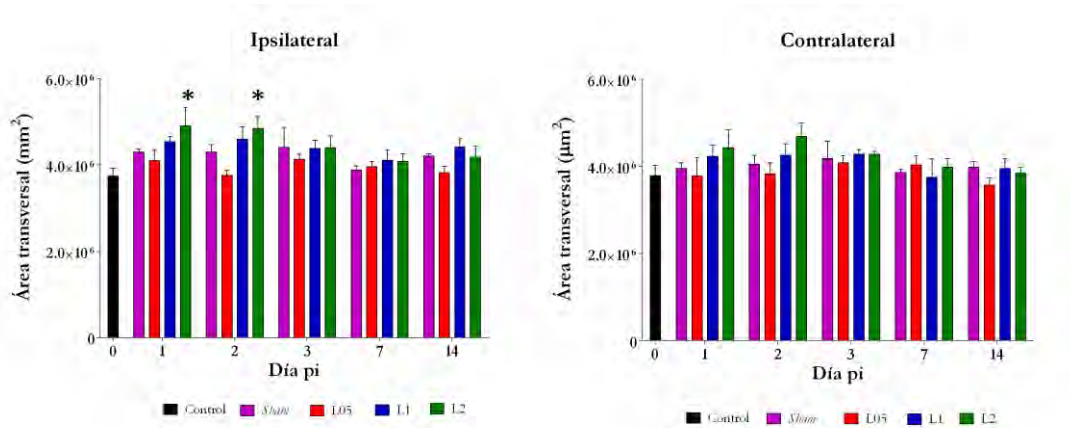


Figura 3.17. Área transversal de las hemimédulas en función del día pi. * L2 *vs.* control. Los datos se expresan como Media \pm SEM; * $P < 0,50$.

El recuento neuronal basado en la tinción de violeta de cresilo se llevó a cabo para los lados ipsilateral y contralateral de las secciones cervicales de los segmentos C5 (**Fig. 3.18**). El número total de neuronas fue significativamente menor para el grupo L2, en comparación con el resto de los grupos, en el lado ipsilateral, al día 3 pi ($P = 0.0279$), y significativamente menor que el del grupo control en el día 7 pi ($P = 0.0002$). En el día 14 pi, el número total de neuronas para el grupo L2 fue significativamente menor con respecto a los grupos control y sham ($P = 0.0326$). No se observaron diferencias significativas entre los números totales de neuronas en el lado contralateral entre los grupos.

Se realizó, asimismo, la estimación del número total de neuronas para todo el segmento C5. No se registraron diferencias significativas entre los grupos con excepción del grupo L2, cuyo total de neuronas por segmento fue significativamente menor con respecto al del grupo control al día 7 pi ($P =$

0,0309) y al de los grupos control y *sham* al día 14 pi ($P = 0,0104$). No se registraron diferencias significativas entre los grupos para el lado contralateral, en ninguno de los días pi. Los valores para el lado ipsilateral por grupo y día pi se muestran en la **Tabla 3.1**.

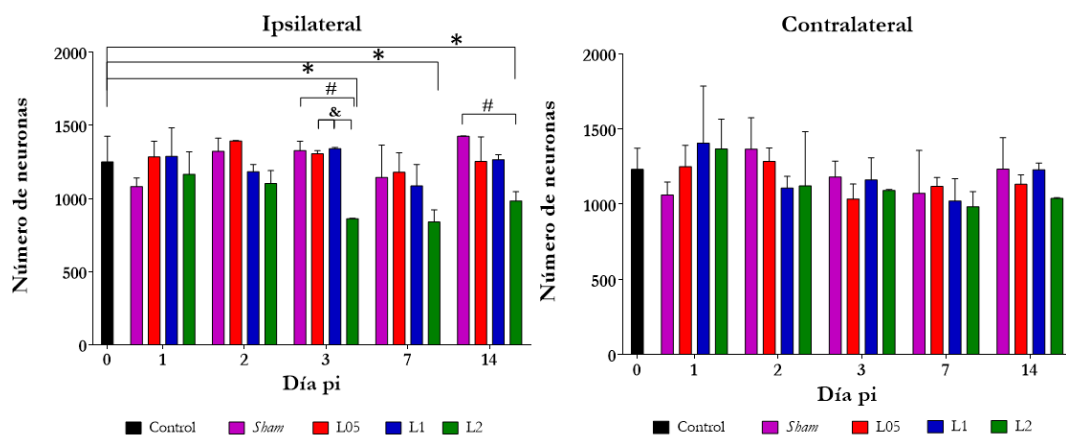


Figura 3.18. Recuento neuronal basado en la tinción de violeta de cresilo, para las hemimédulas ipsilateral y contralateral. * L2 *vs.* control; # L2 *vs.* *sham*; & L2 *vs.* L05 y L1. Los datos se expresan como Media \pm SEM; *,#,& $P < 0,50$.

Día pi ^a	Control	<i>Sham</i>	L05	L1	L2
0	248200 \pm 31230				
1		214300 \pm 14278	248100 \pm 19919	269500 \pm 57300	253300 \pm 35100
2		269000 \pm 27628	267700 \pm 9200	224850 \pm 8550	222300 \pm 45000
3		261350 \pm 8950	233950 \pm 12150	250300 \pm 13900	195300 \pm 400
7		221733 \pm 50432	227800 \pm 3500	210700 \pm 200	182250 \pm 18450*
14	250750 \pm 26734	263900 \pm 21099	238550 \pm 23050	249450 \pm 1150	196700 \pm 5200*
Día pi ^b	Control	<i>Sham</i>	L05	L1	L2
0	258431 \pm 14400				
1		218920 \pm 17380	229300 \pm 16800	232600 \pm 53600	223560 \pm 28000
2		216600 \pm 36000	244500 \pm 21600	218700 \pm 11900	212100 \pm 51100
3		218000 \pm 18300	240760 \pm 32400	229780 \pm 20100	225270 \pm 22200
7		224200 \pm 48000	233950 \pm 15700	222100 \pm 21100	222270 \pm 10100
14	228650 \pm 21500	223300 \pm 29600	245320 \pm 15800	215800 \pm 19000	209400 \pm 9770

Tabla 3.1. Recuento estimado por segmento, para la hemimédula ipsilateral^a, y contralateral^b. Los datos se presentan como Media \pm SEM. * $P < 0,05$

La evaluación de los parámetros morfométricos se llevó a cabo sobre la sustancia gris, dividida en 3 regiones: dorsal, central y ventral; y para cada hemimédula.

Teniendo en cuenta que la descarga de la inyección tuvo lugar en la región media, con principal influencia en la región ventral, a continuación, se detallan las variaciones de los parámetros morfométricos para las poblaciones neuronales de esta región. Luego, se describen las mayores diferencias encontradas para las regiones dorsal y central.

3.1.5.1. Región ventral

La comparación de las áreas neuronales mostró diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. 3.19**). El área promedio de las neuronas del grupo L2 aumentó significativamente hacia el día 3 pi, se redujo al día 7 pi, pero luego volvió a subir al día 14 pi, en el lado ipsilateral. El valor máximo para el área neuronal del grupo L1 se registró hacia el día 7 pi en el lado ipsilateral y en el día 14 pi para el lado contralateral. El valor promedio máximo para el grupo L05 se registró en el día 7 pi, para ambas hemimédulas.

Los valores correspondientes al parámetro de área neuronal fueron, además, representados mediante el diagrama de cajas, de forma tal de poder analizar cualitativamente las características de las neuronas presentes en dicha región a lo largo de los días pi (**Fig. 3.20**). Al analizar el diagrama, se observó una gran dispersión de los valores de área neuronal para todos los grupos. El grupo control mostró una mediana de aproximadamente 100 μm para ambas hemimédulas, siendo mayor la dispersión de los valores de la mitad inferior de la caja que la de aquellos correspondientes a la mitad superior.

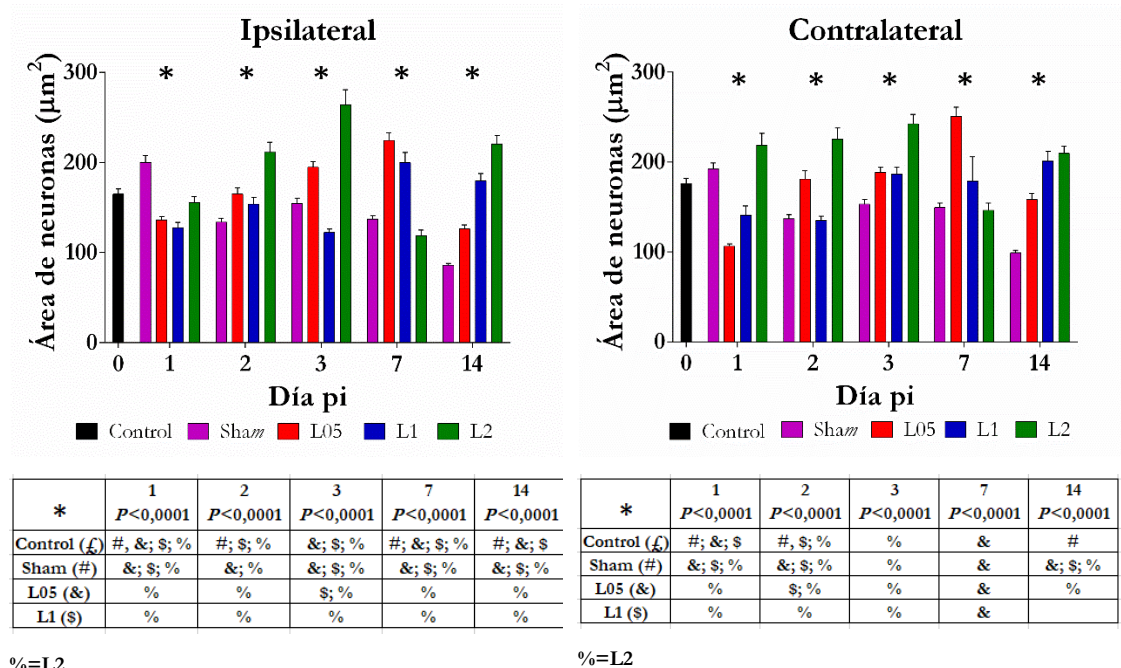


Figura 3.19. -Izquierda. Arriba: Áreas de neuronas para la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Derecha. Arriba: Áreas de neuronas para la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

En el grupo *sham*, se observó una reducción en el área de las neuronas hacia el día 14 pi. Este comportamiento fue el mismo para ambas hemimédulas.

El grupo L05 mostró inicialmente una reducción (en el día 2 pi) del tamaño de las neuronas, que se revirtió hacia el día 3 pi. Estos valores se redujeron en días sucesivos. En cuanto al lado contralateral, se observó un aumento inicial en el tamaño de las neuronas, que se redujo al final del experimento, donde se alcanzaron los valores mostrados por el grupo de control.

Para el grupo L1, en el lado ipsilateral, se observó una reducción de la dispersión de valores por encima de la mediana. En el día 7 pi, la dispersión en este rango de valores aumentó para parecerse a los mostrados por el grupo de control. Al día 1, el lado contralateral mostró un aumento notable en la dispersión de los valores tanto arriba como debajo de la mediana, pero en los días siguientes se comportó como el lado ipsilateral.

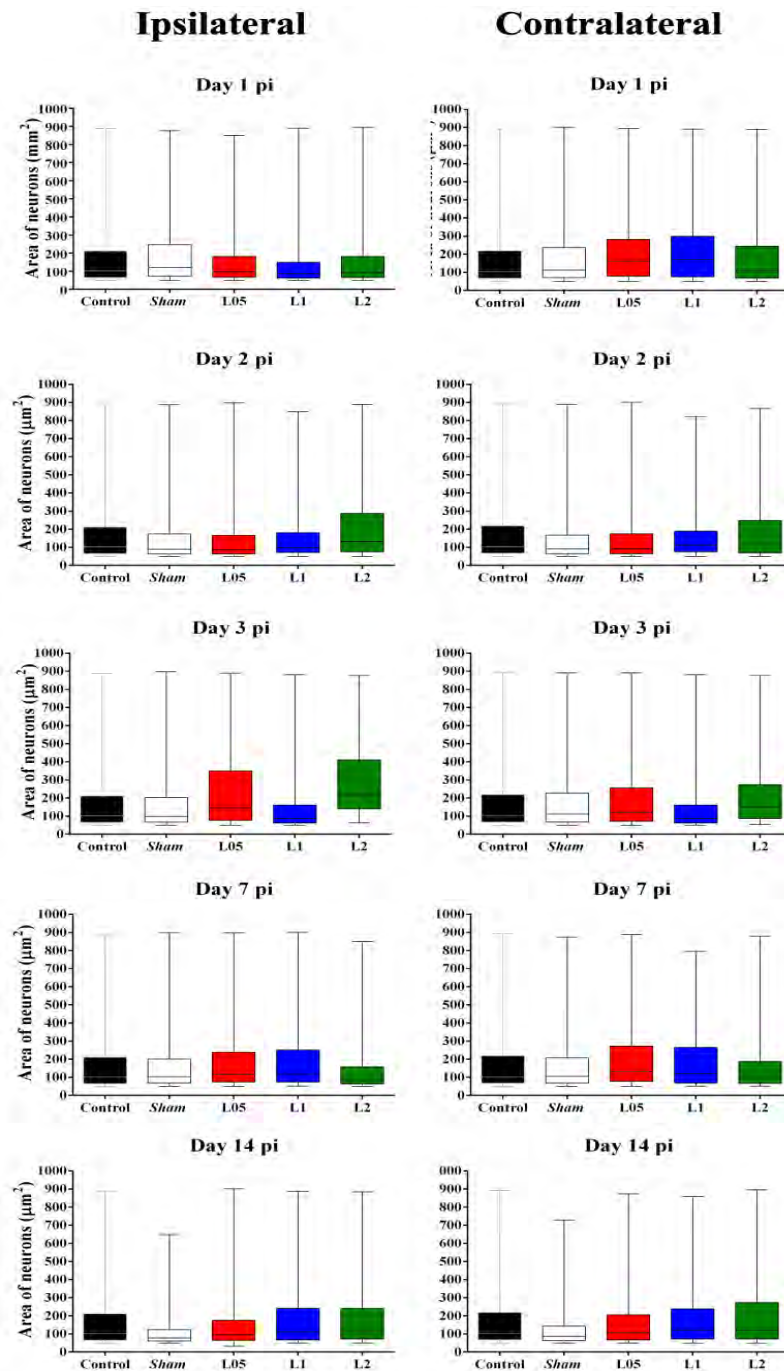


Figura 3.20. Representación mediante gráfico de cajas y bigotes del parámetro morfométrico área neuronal en la región ventral, por día pi y para ambas hemimédulas. El gráfico muestra la distribución de los tamaños neuronales mediante la representación gráfica de los cuartiles, la mediana y los valores mínimo y máximo para todos los grupos, por día pi y para ambas hemimédulas.

Por su parte, los cambios en la amplitud y ubicación de la caja correspondiente al grupo L2 evidenció una reducción inicial del tamaño de sus neuronas que comenzó a revertirse en el día 2 pi, con una mayor dispersión de los valores por encima de la mediana. Hacia el día 3 pi se observó un aumento notable del área de neuronas, seguido de una nueva reducción en el tamaño de la caja hacia el día 7 pi. En el lado contralateral, las neuronas se comportaron en forma similar al grupo control, aunque se observó cierta variabilidad en el tamaño.

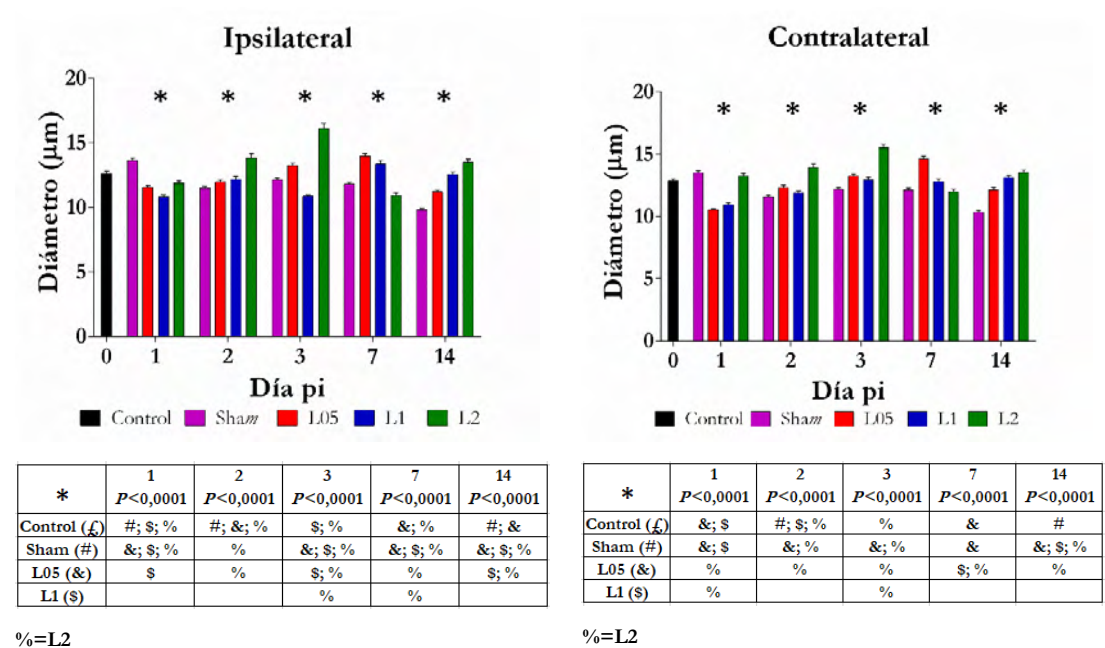
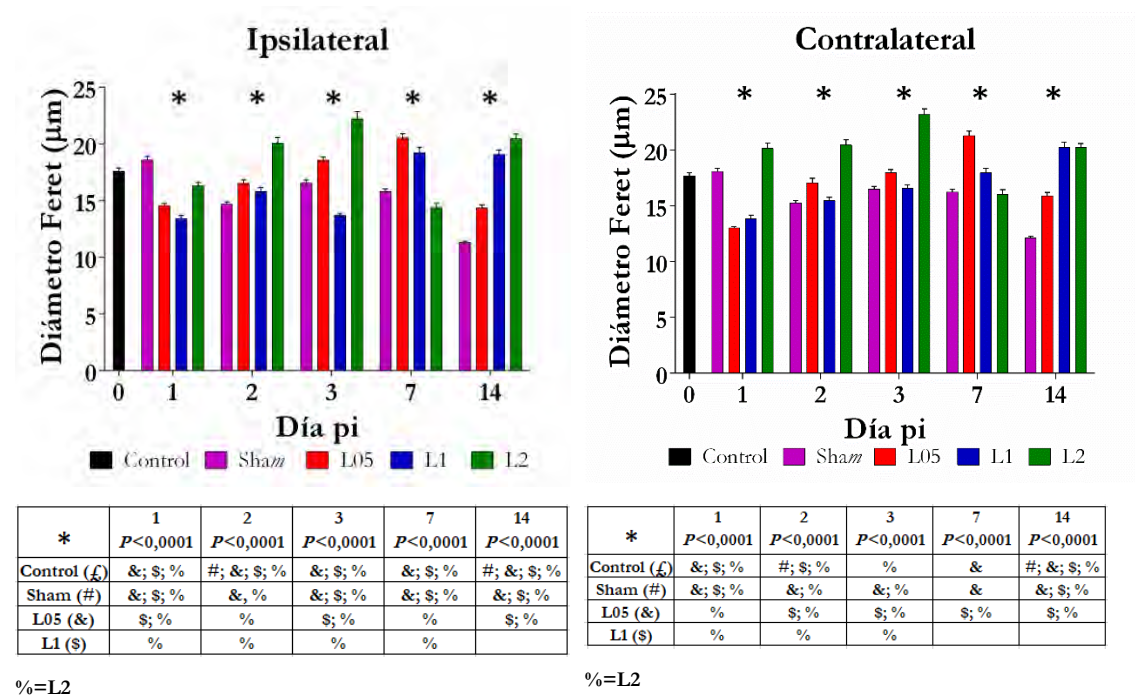


Figura 3.21. -Izquierda. Arriba: Diámetros de las neuronas para la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM. **Derecha. Arriba:** Diámetros de las neuronas para la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Para el parámetro correspondiente al diámetro neuronal se hallaron diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. 3.21**). El grupo L2 mostró el mayor valor en la mayoría de los días pi para ambas hemimédulas y, al igual que para el parámetro área, el valor máximo se observó en el día 3 pi. El grupo L1 mostró su valor máximo al día 7 pi en el

lado ipsilateral y al día 14 pi en el lado contralateral, mientras que el grupo L05 alcanzó su valor máximo en ambas hemimédulas al día 7 pi.

Para el parámetro diámetro feret de las neuronas, se hallaron diferencias significativas en todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. 3.22**). El grupo L2 mostró su valor promedio máximo al día 3 pi en ambos lados, el grupo L1 lo hizo al día 7 pi del lado ipsilateral y al día 14 pi del lado contralateral. Por su parte, el grupo L05 tuvo su valor máximo de diámetro feret en el día 7 pi, para ambas hemimédulas.



Para el parámetro correspondiente al perímetro neuronal, se hallaron diferencias significativas entre los grupos, para todos los días pi, en ambas

hemimédulas (**Fig. 3.23**). El grupo L2 tuvo su valor promedio máximo al día 14 pi en el lado ipsilateral, y al día 1 pi en el lado contralateral. El grupo L1 mostró su valor máximo al día 7 pi, en el lado ipsilateral y al día 14 pi, en el lado contralateral. El valor máximo para el grupo L05 se registró en ambas hemimédulas al día 7 pi.

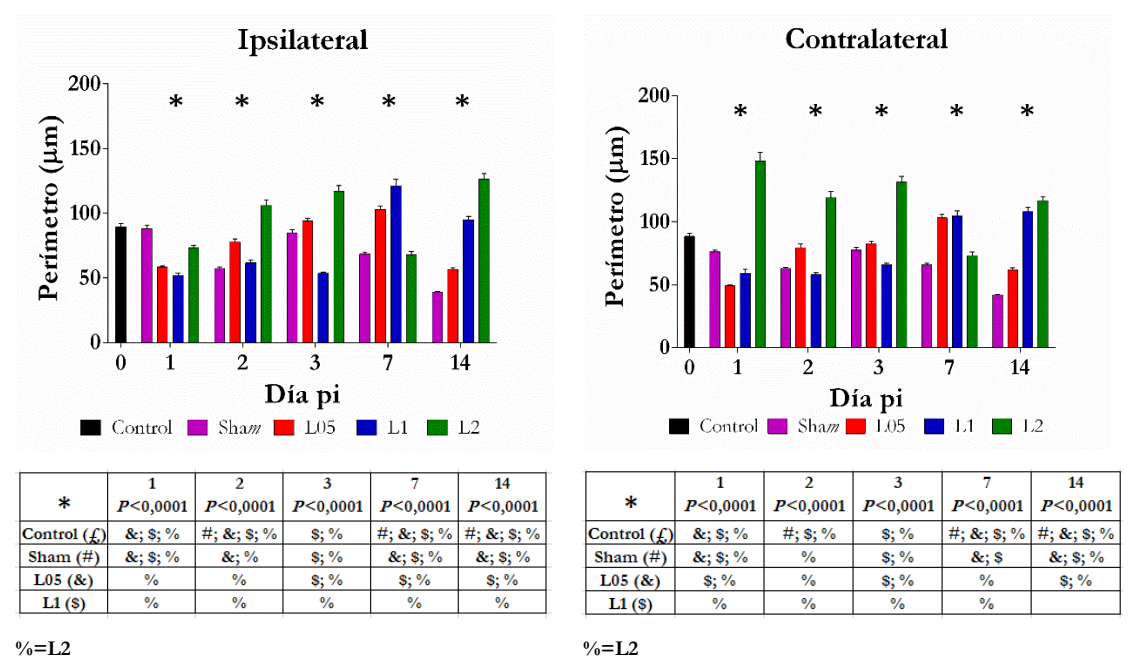


Figura 3.23. -Izquierda. Arriba: Perímetro de las neuronas para la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media ± SEM. **Derecha. Arriba:** Perímetro de las neuronas para la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media ± SEM.

Para el parámetro correspondiente a la redondez de las neuronas, se hallaron diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi en ambas hemimédulas (**Fig. 3.24**). El grupo L2 se comportó de igual forma que para el parámetro perímetro; el grupo L1 mostró su valor máximo en ambas hemimédulas al día 7 pi y el grupo L05 al día 3 pi, en el lado ipsilateral y al día 7 pi, en el lado contralateral.

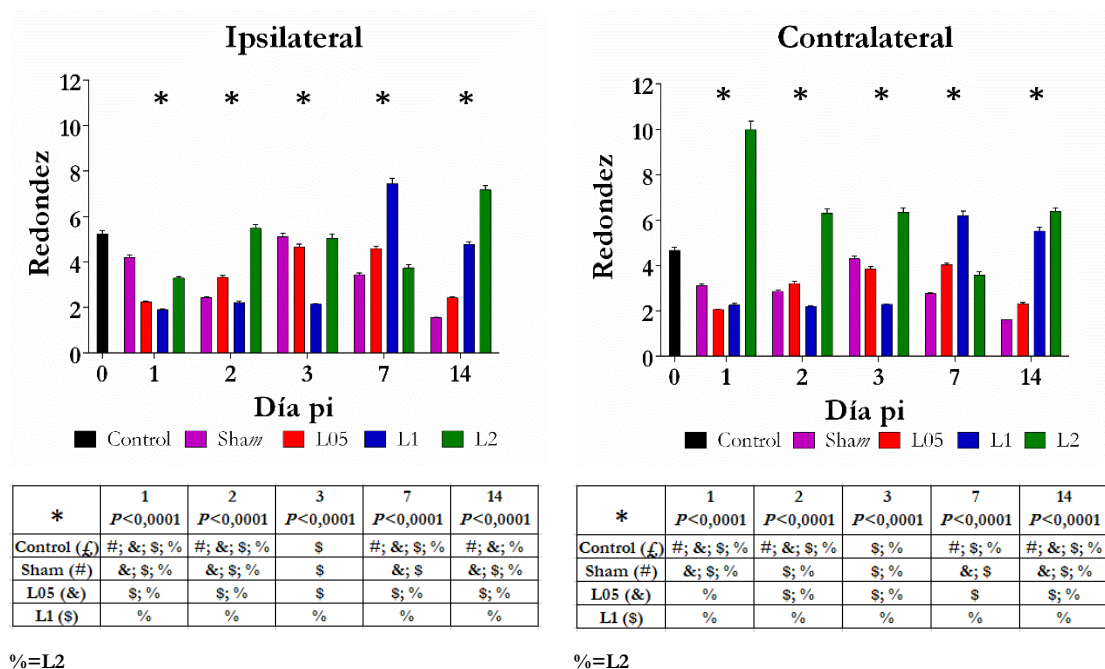


Figura 3.24. -Izquierda. Arriba: Redondez de las neuronas para la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Derecha. Arriba: Redondez de las neuronas para la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

3.1.5.2. Regiones dorsal y central

El análisis de todos los parámetros morfométricos de las regiones dorsal y media permitió observar diferencias significativas entre los diferentes grupos para todos los días pi en ambas hemimédulas. El grupo L2 mostró valores significativamente mayores respecto de los demás grupos en los días 2 y 3 pi, para todos los parámetros y para ambas hemimédulas. El grupo L1 alcanzó sus valores máximos al día 7 pi en todos los parámetros y para el lado ipsilateral, siendo su comportamiento más variable en el lado contralateral. El grupo L05 inicialmente mostró valores menores a los del grupo control, pero que se asemejaron a éstos hacia el día 3 pi, en todos los parámetros y para el lado ipsilateral. En la región media, los valores de este grupo se incrementaron

gradualmente hasta alcanzar su máximo para todos los parámetros al día 7 pi, en el lado ipsilateral, mientras que en el lado contralateral su comportamiento fue similar al del grupo control, para todos los parámetros y en todos los días pi. Los gráficos para los diferentes parámetros morfométricos por hemimédula y región, junto con los correspondientes datos estadísticos se presentan en el Anexo 1.

3.1.6 DISCUSIÓN

El objetivo de esta primera etapa fue evaluar los efectos clínicos, de comportamiento, tisulares y celulares producidos por la inyección intraparenquimatosa de diferentes concentraciones de lidocaína en la médula espinal cervical de la rata.

Todos los animales incrementaron su peso corporal a lo largo de los 14 días pi siguiendo un patrón de aumento similar. Sin embargo, en todos los días pi la ganancia de peso del grupo control fue significativamente mayor a la del resto de los grupos. Se ha postulado que el peso corporal puede experimentar variaciones luego de un proceso quirúrgico, debido tanto al estrés que pueda ocasionar la cirugía, como a cualquier tipo de dolor posquirúrgico que el animal pueda experimentar (Brennan *et al.*, 2009). Es posible, entonces, que dichos efectos sean los causantes de la ganancia de peso inferior registrada para todos los animales sometidos a la cirugía en contraposición con los animales intactos. Aunque para la prueba de sensibilidad al calor no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a lo largo de todo el experimento, en el día 1 pi los grupos tratados con lidocaína mostraron un menor tiempo de latencia en comparación con los controles. Se cree que la liberación de neuropéptidos inducida por AL a partir de neuronas sensoriales contribuye a la sensibilización del asta dorsal espinal (Leffler *et al.*, 2008). De acuerdo con Bosshard *et al.*, (2012), las concentraciones de lidocaína inferiores al 2% podrían ser responsables de un estado hiperalgésico en animales de experimentación. El grado de sensibilidad al estímulo térmico experimentado por esos animales sería dependiente de la concentración aplicada. Sin embargo, la relación entre ambas variables no es lineal, dado que la mayor sensibilidad se determinó para una concentración intermedia de lidocaína (Bosshard *et al.*, 2012). De manera similar, se observó una gran variabilidad en la respuesta de los animales que

recibieron 1 % lidocaína en nuestro trabajo. Aunque el tiempo de latencia para todos los grupos aumentó en los días siguientes, este aumento no fue significativo. La almohadilla plantar de la rata posee fibras de tipo A δ y C, las primeras son estructuras de conducción rápida que median el inicio rápido de sensaciones de dolor y la segunda, son fibras conductoras más lentas, que intervienen en las sensaciones de dolor de latencia prolongada. A su vez, los nociceptores de fibras A se clasifican en dos tipos de acuerdo con su capacidad de respuesta a estímulos de calor (Treede *et al.*, 1995): fibras aferentes de tipo I, que tienen umbrales de activación elevados y fibras aferentes de tipo II que tienen un umbral de calor inferior y que se hallan ausentes en la piel glabra. Cuando el estímulo térmico supera los 53 ° C, el tiempo medio de activación y respuesta de las fibras de tipo I es de 5 segundos (Schepers & Ringhamp, 2010). Por otro lado, el umbral de calor para activar las fibras aferentes C está por debajo de los umbrales del dolor (aproximadamente 45 ° C), lo que sugiere que el umbral de dolor térmico depende de la suma temporal de la actividad aferente. Todos estos hechos, sumados a una posible adaptación de los animales a la temperatura (Luukko *et al.*, 1994) podrían explicar el aumento del tiempo de latencia observado a lo largo del experimento para todos los grupos.

Las diferencias significativas observadas en las pruebas motoras, como el tiempo de suspensión y la cantidad de errores registrados para la prueba de desplazamiento en la escalera horizontal, pueden resultar paradójicas. Se ha demostrado que, en diferentes animales, incluso cuando una lesión se produce exactamente en el mismo sitio anatómico, puede causar diferentes alteraciones anatómicas, desencadenando así, diferentes respuestas en el área dañada cuando se expone a una lesión (Metz & Wishaw, 2002). Esto permitiría sugerir que la anatomía neural individual también podría ser causa de la variación observada en el comportamiento de los grupos L1 y L2 en las pruebas motoras. Los déficits de las extremidades torácicas pueden manifestarse de diferentes

maneras en la función motora después de una lesión cervical alta de la médula espinal. Así, pueden observarse retrasos temporales en el desarrollo de los reflejos y la locomoción, o pueden persistir durante cierto tiempo patrones de movimiento anormales (Diener & Bregman, 1998). El aumento del grado de severidad de la lesión disminuiría la resistencia de las extremidades torácicas, lo cual puede evidenciarse como una reducción del tiempo de suspensión que puede ser consecuencia de una reducción en la fuerza de agarre. Esta disminución en la fuerza de la extremidad torácica puede ser el resultado de una pérdida gradual de neuronas motoras en los segmentos C5-C6 que envían proyecciones hacia dichas extremidades (Pearse *et al.*, 2005). Asimismo, después de una lesión unilateral, los animales compensan parcialmente la pérdida de función en las extremidades dañadas mediante ajustes posturales y el soporte del peso corporal sobre las extremidades intactas (Metz & Whishaw, 2002). En este sentido, la prueba de desplazamiento en la escalera horizontal permite medir la compensación, al revelar los errores de colocación del miembro correspondiente al lado intacto (contralateral) (Metz & Whishaw, 2002). De este modo, puede postularse que, tanto el aumento significativo de errores en la escalera horizontal registrado para el grupo L2 en el miembro contralateral, así como el tiempo de latencia observado para este grupo en la prueba de suspensión en el aire, responderían a la compensación por parte del miembro contralateral a raíz de una lesión en el miembro ipsilateral. Dicha lesión, a su vez, determinaría la disminución de pasos totales registrados en la escalera a lo largo del tiempo.

Por otra parte, la inyección de 2 % lidocaína redujo significativamente el recuento neuronal entre los días 3 y 14 pi en el lado ipsilateral del segmento C5; a la vez que se observó la presencia de células en degeneración en este grupo al día 3 pi. Mediante estudios *in vitro* se estableció que la lidocaína, a las concentraciones que rutinariamente se inyectan en el espacio subaracnoideo

para la anestesia espinal, puede inducir apoptosis y necrosis en neuronas maduras. La inyección de 0,5 % y 1 % lidocaína produce un aumento de $\text{Ca}^{+2}_{\text{cit}}$, que luego de unos minutos retorna al valor basal; mientras que 2,5 % y 5 % lidocaína causan un incremento sostenido hasta niveles tóxicos, observándose muerte neuronal luego de un período de 60 min (Johnson *et al.*, 2002). También, en estas últimas concentraciones, la lidocaína despolariza rápidamente la mitocondria neuronal, mientras que, con concentraciones de 37 mM (1 %) y 185 mM (5 %) produce la liberación del citocromo c mitocondrial al citoplasma. La magnitud de estos efectos se mostró dependiente de la concentración (Johnson *et al.*, 2004). En otro estudio, la aplicación de 30 mM lidocaína o de concentraciones mayores sobre neuronas del ganglio dorsal, indujo la muerte neuronal (Gold *et al.*, 1998). La fuente de Ca^{+2} , durante la elevación inicial de corta duración, es el retículo endoplásmico, mientras que el aumento posterior observado con las concentraciones superiores representa un flujo de $\text{Ca}^{+2}_{\text{ext}}$ hacia el interior, a través de la membrana plasmática (Johnson *et al.*, 2002). Al parecer, luego de la injuria mitocondrial producida por la lidocaína, se pondrían en marcha mecanismos de muerte celular que pueden ser dependientes o independientes de caspasas (Johnson *et al.*, 2004).

A concentraciones mucho más bajas de las requeridas para el bloqueo de las corrientes de Na^{+} , la lidocaína afecta receptores acoplados a proteínas G (Johnson *et al.*, 2004). El bloqueo de los canales de sodio, por parte de los AL, se sustenta en la actividad de fosforilación de las enzimas quinasas. Cuando un cultivo de fibroblastos gingivales fue expuesto a concentraciones de lidocaína utilizadas en la práctica para lograr efectos anestésicos locales (10^{-7} - 10^{-5} M), se incrementó el porcentaje de muerte celular por apoptosis, de manera proporcional a la concentración de lidocaína aplicada (Quinteros Villarruel *et al.*, 2011). Dicho efecto, fue mediado por la actividad de la proteína quinasa A (PKA), favorecido por la acumulación de AMPc, e inhibido por la actividad de

la proteína quinasa C (PKC). El máximo grado de apoptosis se registró con 10^{-5} M (0,0002 %) lidocaína y a las 48 horas. En forma similar, en este trabajo de tesis fue posible advertir muerte neuronal significativa sólo en el grupo que recibió la mayor concentración de lidocaína (2%) y alrededor de las 72 h posteriores a la inyección. Si bien la concentración utilizada aquí fue superior a la documentada por Quinteros Villarruel *et al.* (2011), cabe mencionar que estos autores llevaron a cabo un análisis *in vitro*, que requiere concentraciones muy inferiores a las que pueden ser requeridas para la apreciación de un efecto semejante en estudios *in vivo*; con lo cual ambos efectos podrían aún ser comparables.

En este trabajo, el recuento neuronal del grupo inyectado con lidocaína 0,5 % no mostró diferencias significativas en comparación con los animales *sham* y control, lo cual es coincidente con los resultados de Johnson *et al.* (2002), quienes demostraron que la misma concentración de la droga, administrada por vía subaracnoidea, no producía la muerte celular ni las alteraciones del $\text{Ca}^{+2}_{\text{cit}}$ previamente mencionadas.

Otros estudios, *in vitro* e *in vivo*, demostraron que la lidocaína puede ejercer diferentes efectos sobre diferentes y variadas poblaciones celulares y que esos efectos son dependientes de la concentración utilizada. De esta manera, este AL puede aumentar la proliferación celular y mejorar la supervivencia de las células, así como modular algunas vías bioquímicas de relevancia, tales como aquellas involucradas en la expresión génica y la apoptosis (Jejurikar *et al.*, 1997; Lei *et al.*, 2001; Lenfant *et al.*, 2004; Quinteros Villarruel *et al.*, 2011; Quinteros Villarruel *et al.*, 2014). En dos estudios (Portiansky & González, 1995; Quinteros Villarruel *et al.*, 2014), se describieron los efectos de la lidocaína sobre la supervivencia celular como inversamente proporcionales a la concentración aplicada. Aunque se documentaron varios efectos antiinflamatorios dependientes de la dosis de la lidocaína, tanto *in vitro* (Hollmann & Durieux,

2000) como *in vivo* (Gallos *et al.*, 2004; Portiansky & González, 1995), en el presente estudio observamos que la inyección de 2 % lidocaína y, en menor medida, de 1 % lidocaína, provocó una reacción inflamatoria en una magnitud que no se observó en los grupos que recibieron 0,5 % del AL. Además, el aumento del área de la sección ipsilateral, producido por la inflamación, observado en los animales del grupo L2 alcanzó su máximo en los días 1 y 2 pi, lo que podría justificar la posterior disminución en el recuento neuronal registrado en el día 3 pi, probablemente debido a la hinchazón inicial y la posterior necrosis. Sumado a esto, el área neuronal del grupo L2 se incrementó hacia el día 3 pi, lo cual se observó claramente en el gráfico de cajas y bigotes. Esos efectos no se observaron ni en el área ni en el recuento de las neuronas de los grupos L05 y L1.

Aunque no se detectó un exudado celular en los animales inyectados, con la excepción de lo observado cerca del área de entrada de la aguja de inyección, se asumió que la presencia de exudado seroso podría ser la responsable del aumento del área ipsilateral en el grupo L2. Se sabe que concentraciones de lidocaína entre 2-20 mM inhiben la liberación de leucotrieno B4 *in vitro*. El bloqueo de esta liberación explicaría algunos de los efectos beneficiosos de los anestésicos locales sobre la formación de exudado seroso (Hollman & Durieux, 2010). En nuestro caso, la concentración de 0,5 % lidocaína (17 mM) podría justificar la ausencia de dicho exudado.

El aumento de la expresión de GFAP se considera uno de los principales indicadores de la reactividad glial, que se manifiesta, entre otras cosas, en la hipertrofia que sufren estas células, incluidas sus prolongaciones (Haim *et al.*, 2015). En nuestro estudio se observó que la mayor reactividad glial se registró en el grupo *sham* con máxima expresión en el día 3 pi, lo cual es coincidente con la observación de Li *et al.* (2016), quienes describieron este mismo

comportamiento en astrocitos, 3 días después de una laminectomía a nivel de los segmentos T9-T11.

La mayoría de los astrocitos presentes en el SNC expresan niveles indetectables de GFAP en condiciones fisiológicas. Sin embargo, aumentan su expresión después de una lesión (Haim *et al.*, 2015), lo cual coincide con el aumento del área inmunomarcada descrita en este trabajo. La reactividad en el lado contralateral podría estar relacionada, y justificarse, por la liberación de factores cerebrales o sanguíneos, como resultado de una lesión o por la migración de astrocitos, lo que implicaría una activación previa (Jegliński *et al.*, 1995). Los astrocitos tienen múltiples receptores y su actividad está influenciada por la acción de numerosas citoquinas. La lidocaína puede, a su vez, reducir o inhibir la producción de citoquinas e interleuquinas implicadas en la activación de procesos inflamatorios (Su *et al.*, 2010; Chiu *et al.*, 2016). Esto puede explicar, al menos en parte, la reducción en la reactividad de la población de astrocitos en el segmento C5 cuando se aplicaron las diferentes concentraciones de lidocaína. Las diferencias observadas entre la expresión de GFAP de los grupos inyectados con lidocaína y aquella de los grupos control y *sham* también fueron observadas por Chen *et al.* (2009). Estos autores describieron que ratas *sham* mostraron un aumento en la inmunorreactividad para GFAP del lado ipsilateral, mientras que en los animales que recibieron 2 % lidocaína dicha inmunorreactividad disminuyó drásticamente. Estos autores sugirieron que la lesión mecánica del tejido nervioso podría aumentar la liberación de glutamato, que posteriormente induciría la activación de astrocitos. La lidocaína, a su vez, reduciría la liberación de glutamato y, por lo tanto, inhibiría la activación de los astrocitos (Chen *et al.*, 2009).

Por lo general, las lesiones de la médula espinal destruyen neuronas y células gliales, incluyendo las conexiones axónicas entre los sistemas sensoriales y el sistema motor, lo que conduce a la pérdida de destrezas sensitivas y motrices.

Los neurofilamentos son los componentes proteicos más abundantes de las neuronas y, por lo tanto, se liberan en grandes cantidades de las neuronas dañadas y muertas. Por esta razón, en la actualidad se considera a los neurofilamentos como marcadores biológicos de daño neuronal y de regeneración (He & Nan, 2016; Mitra *et al.*, 2013; Shaw *et al.*, 2005).

En ciertas enfermedades neurodegenerativas se producen alteraciones de esta proteína. Dichas alteraciones se manifiestan como dilataciones del axón e inclusiones somáticas que contienen la proteína NF fosforilada (Morrison *et al.*, 2000). La forma hiperfosforilada pNF-H es detectable en el suero y la magnitud de su presencia puede correlacionarse con el grado de injuria axonal, degeneración y muerte neuronal. Shaw *et al.* (2005) describieron que, en un modelo experimental en ratas, luego de una injuria de la médula espinal, la expresión de pNF-H se incrementaba horas después de la lesión y nuevamente, aunque en menor magnitud, hacia el día 3 pi. Postularon que el aumento inicial se debía al daño agudo producido por la injuria sobre los axones, mientras que el segundo aumento se debía a la degeneración axonal secundaria. En otro estudio en el que los animales fueron sometidos a una injuria traumática, la expresión de NF, tanto en la sustancia gris como en la blanca, se redujo con respecto al grupo control, desde el día 1 pi y hacia el día 3 pi (He y Nan, 2016). En nuestro estudio, el incremento de la expresión de NF disperso en la matriz de la sustancia gris, registrado para los grupos inyectados con lidocaína, podría relacionarse tanto con procesos de regeneración celular, como con procesos de degeneración o muerte neuronal, de acuerdo con las diferentes concentraciones aplicadas. En los animales que recibieron 2 % lidocaína y para los cuales se registró una reducción significativa del número de neuronas, se evidenció, además, una reducción de la marca de NF en la sustancia blanca para el día 1 pi. La menor concentración aplicada, por otro lado, incrementó la expresión de NF en la sustancia blanca hacia el día 14 pi, con lo cual podría sugerirse que la

expresión de NF registrada para este grupo se relaciona con un efecto promotor de la regeneración axonal. La tinción con *luxol fast blue*, por su parte, no permitió evidenciar alteraciones en las fibras nerviosas para ninguna de las concentraciones aplicadas.

Dado que la bibliografía no registra otros estudios en los que la lidocaína hubiese sido inyectada por vía intraparequimatoso dentro de la médula espinal, no es posible argumentar en contra de otros resultados. Sin embargo, estudios realizados con mayores concentraciones de lidocaína han demostrado que este AL puede ser tóxico para el tejido nervioso (Kim *et al.*, 2016) y para cultivos neuronales (Johnson *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2016). Además, se describe que concentraciones de lidocaína del 2.5 % al 10 % inducen efectos citotóxicos severos, incluso cuando se administran por vía intravenosa, epidural o intratecal (Cherng *et al.*, 2011; Muguruma *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2014). Estudios *in vivo* realizados por Hampl *et al.* (2014) mostraron que 2 % lidocaína administrada por vía intratecal no causa cambios histopatológicos o estructurales en la médula espinal, mientras que los estudios realizados por Ready *et al.* (1985) informaron que los cambios histopatológicos de la médula espinal y los déficits neurológicos ocurren con concentraciones de lidocaína superiores al 8 %. Debe señalarse que, en esos estudios, la administración de lidocaína se llevó a cabo por la vía intratecal y, por lo tanto, la concentración respectiva en el área objetivo sería menor, pero la relación entre ambas concentraciones y sus efectos sobre el tejido podrían asemejarse a los producidos por 0,5 % y 2 % lidocaína, utilizadas en nuestros experimentos. Sin embargo, los ensayos clínicos que usan lidocaína son controvertidos. Se postuló que una concentración superior al 1 % lidocaína, administrada por vía intratecal, es un factor crítico para la neurotoxicidad (Liu *et al.*, 2001). Además, algunos estudios utilizaron modelos de nervios periféricos y mostraron que la toxicidad electrofisiológica de la

lidocaína depende del tiempo y la concentración, comenzando con la de 1 %, con una ablación irreversible del potencial de acción al 2 % (Liu *et al.*, 2001).

El grupo inyectado con 0,5 % lidocaína no presentó alteraciones en su comportamiento motriz y sensitivo como tampoco presentó alteraciones histológicas evidentes en las secciones del segmento C5 de la médula espinal, por lo que fueron similares a aquellos resultados observados en los grupos *sham* y control. Por ende, la inyección intraparenquimatosa de 0,5 % lidocaína puede considerarse como la concentración óptima de este AL, que no produce daño neuronal ni induce respuesta inflamatoria.

Los compuestos de bajo peso molecular tienen buena difusividad en el SNC. Sin embargo, la pérdida de estos a través de los capilares y, en algunos casos, debido a los procesos metabólicos, limita la difusión de los fármacos a unos pocos milímetros del sitio de descarga (Bobo *et al.*, 1994). Una vez seleccionada la concentración ideal de lidocaína para nuestros propósitos, quisimos verificar si este fármaco también era inocuo en las adyacencias del segmento C5. Con este fin se llevó a cabo el recuento neuronal basado en la tinción de violeta de cresilo, sobre secciones de los segmentos C4 y C6 de los animales del grupo L05 y se los comparó con los correspondientes a los mismos segmentos de los grupos control. No se hallaron diferencias significativas entre el número de neuronas de los grupos, para ninguno de los días estudiados, y para ambas hemimédulas (**Fig. A37** en el Anexo 1). Esto significa que la concentración seleccionada no ejerce ningún tipo de daño en los segmentos adyacentes al sitio de inyección.

3.2. ETAPA 2: Inyección intraparenquimatosa simultanea de la concentración seleccionada de lidocaína y KA

3.2.1. Ausencia de interacción química entre el KA y la lidocaína

Para descartar una posible interacción química entre los compuestos, se realizó un estudio cromatográfico utilizando un equipo HPLC. Las soluciones de KA 1 mM y de lidocaína 0,5% fueron introducidas en este equipo antes de ser simultáneamente probadas en los animales de experimentación. Así, se establecieron los tiempos de retención de ambas sustancias y se obtuvieron los espectros de masas correspondientes. De esta manera, se estudiaron las distintas concentraciones de lidocaína por separado (correspondiente a los grupos L05, L1, L2) y su interacción con el KA (que representarían a los grupos KA1L05, KA1L1 y KA1L2).

El cromatograma obtenido para la solución L05 mostró un pico con un tiempo de retención (t_r) de 2,67 min (**Fig. 3.25**). Para la obtención del espectro de masas y debido a su identidad química (amida), la lidocaína (PM=234) se observó en modo positivo, y mostró un pico de mayor abundancia (PM=235,1) correspondientes a [lidocaína + H^+] y uno de abundancia menor (PM=236,1) correspondiente a [lidocaína + $2H^+$] (**Fig. 3.26**). De este modo, se determinó el tiempo de retención de la lidocaína y se comprobó su identidad química.

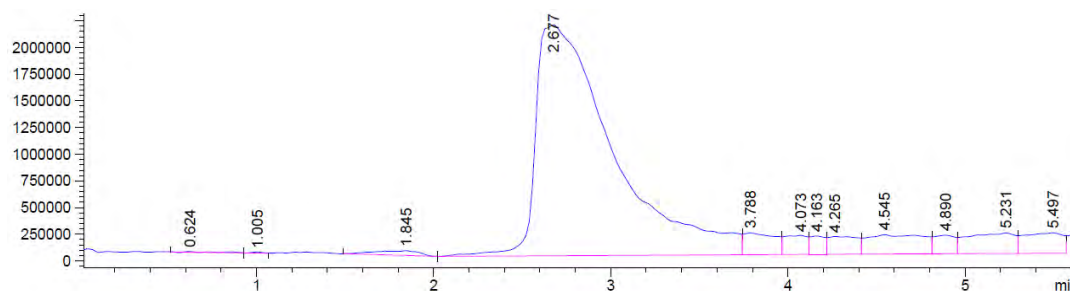


Figura 3.25 Cromatograma de la solución L05, con $t_r=2,67$ min.

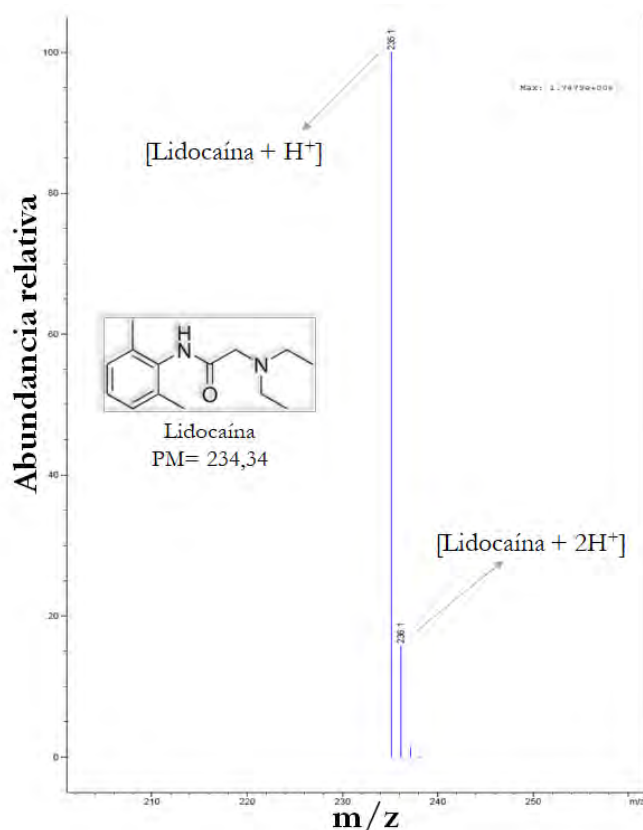


Figura 3.26 Espectro de masas de lidocaína 0,5%, en modo positivo. Se aprecia un pico de abundancia máxima (PM=235,1), correspondiente a [lidocaína-H⁺] y otro de abundancia menor (PM=236,1), correspondiente a [lidocaína-2H⁺].

Para la solución de KA1, el cromatograma reveló un único pico con un t_r de 2,58 min (**Fig. 3.27**).

Debido a la identidad química del KA (PM=213; ácido carboxílico), se seleccionó el modo negativo para su análisis en el espectrómetro de masas, aunque fue posible analizarlo también en modo positivo. El espectro de masas obtenido mostró un pico de abundancia máxima (PM=212,0), junto a otro de abundancia menor (PM=213,0), correspondientes a [KA- H⁺] y [KA] respectivamente (**Fig. 3.28**).

Para el análisis de la solución KA1L05, se realizó el análisis cromatográfico, seguido del análisis en el espectrómetro de masa en ambos modos: positivo y

negativo, ya que cada uno optimiza la visualización de cada uno de los componentes de la mezcla.

El cromatograma mostró un pico de $t_r=2,7$ min (**Fig. 3.29**), que correspondía a dos sustancias, una de $t_r=2,69$ (lidocaína) y otra de $t_r=2,54$ (KA).

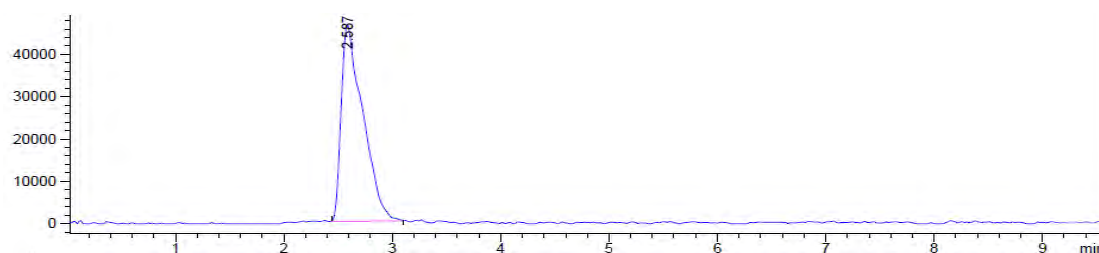


Figura 3.27 Cromatograma de KA 1 mM, con $t_r=2,58$ min.

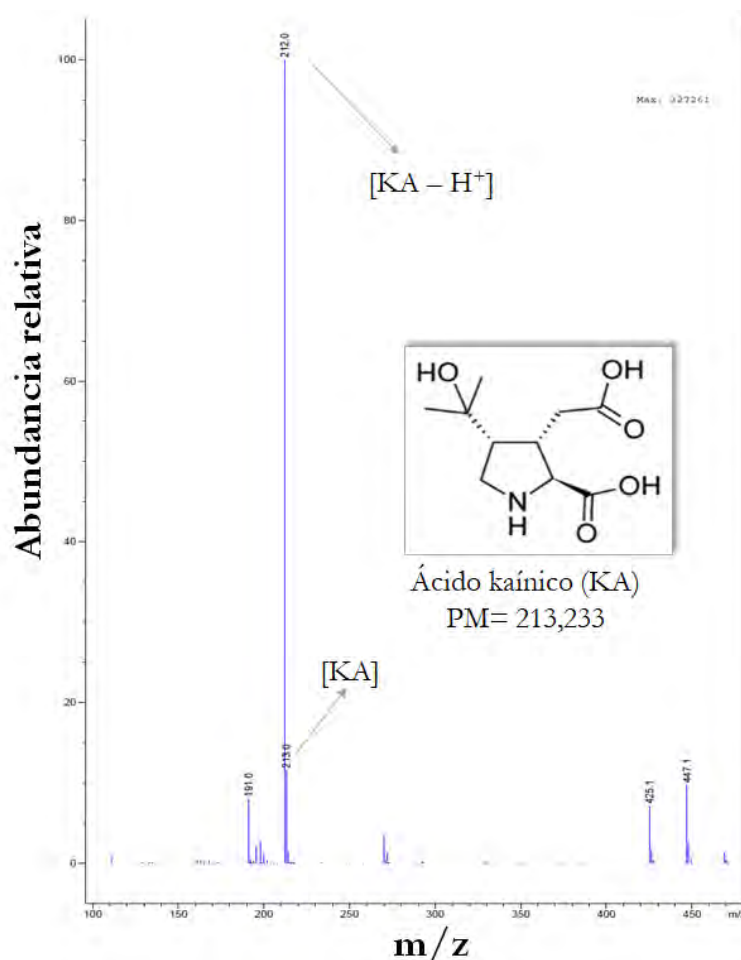


Figura 3.28 Espectro de masas de KA 1 mM, en modo negativo. Se aprecia un pico de abundancia máxima (PM=212,0), correspondiente a $[KA - H^+]$ y otro de abundancia muy inferior (PM=213,0), correspondiente a $[KA]$.

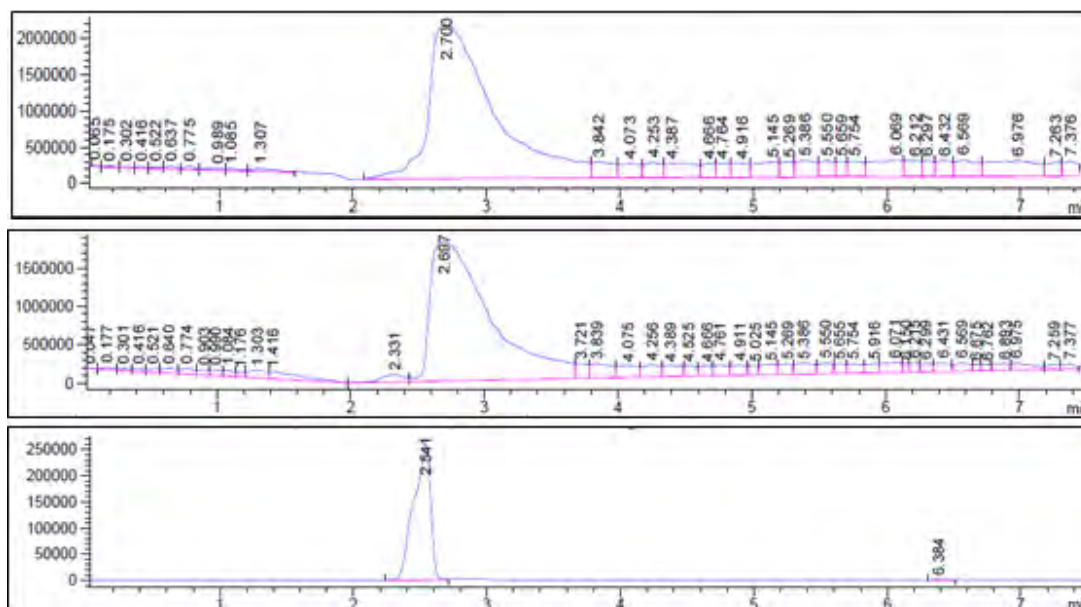


Figura 3.29 Cromatograma de la solución KA1L05. El pico original de $t_r=2,7$ min se desdobló como 2 picos con $t_r=2,69$ min y $t_r=2,54$ min, correspondientes a lidocaína y KA, respectivamente.

Estos picos cromatográficos fueron resueltos en el espectrómetro de masa, en modo positivo, como un pico de abundancia máxima de $PM=235,1$ y dos picos de menor abundancia, uno de $PM=236,1$ y otro alrededor de $PM=213$ (**Fig. 3.30**).

Los cromatogramas obtenidos para las soluciones KA1L1 y KA1L2 fueron similares a la de la solución KA1L05, con un pico que pudo desdoblarse, en ambos casos, en 2 picos con t_r coincidentes con los de lidocaína y KA. Los correspondientes cromatogramas se presentan en el Anexo 1.

De este modo, se concluyó que el KA y la lidocaína coexisten inalterados en la solución mezcla sin alteración y/o interacción química a causa de o entre ellas, independientemente de la concentración de lidocaína utilizada.

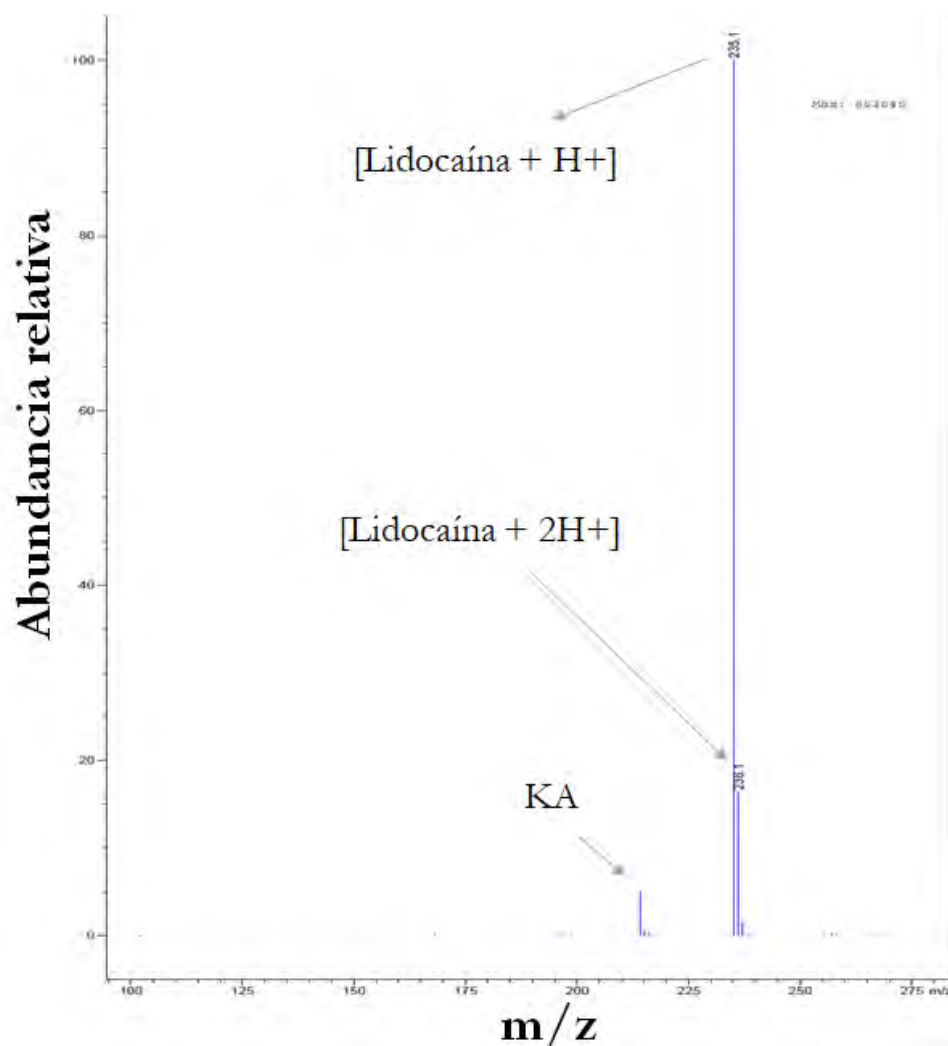


Fig. 3.30 Espectro de masa de la solución KA1L05. Se observó un pico de abundancia máxima de PM:235,1 correspondiente a [lidocaína+H⁺], uno de PM: 236,1 correspondiente a [lidocaína+2H⁺], y uno de PM: 213 correspondiente a KA.

3.2.2. Inyección simultánea de lidocaína 0,5% y KA 1 mM

3.2.2.1. Estado general y comportamiento motriz

Durante la cirugía, los animales del grupo KA1 exhibieron una contracción de los músculos flexores del miembro torácico derecho, hecho que fue considerado como un signo positivo de la inyección. Esta particularidad no fue exhibida por los animales inyectados con la mezcla de KA y lidocaína (KA1L05). Las ratas se recuperaron de la anestesia alrededor de 40-90 min

después de la cirugía. Al despertar, los animales inyectados con KA1 mostraron una atonía del miembro derecho, que se mantuvo durante 48 h, mientras que los animales del grupo KA1L05 no mostraron ningún tipo de signo distintivo, apoyaban el miembro derecho y éste era funcional.

Solo los animales inyectados con KA1 exhibieron pérdida de apetito o locomoción, más allá del tiempo requerido para la recuperación post- anestésico (40-90 min) y por un tiempo no superior a 1-2 días.

3.2.2.2. Evaluación del peso

El peso corporal de los animales de los grupos L05 y KA1L05 se incrementó a partir del día 3 pi y hacia los días 7 y 14 pi (**Fig. 3.31**). La ganancia de peso experimentada por estos animales hacia el día 14 pi fue significativamente mayor con respecto a la de los animales del grupo KA1.

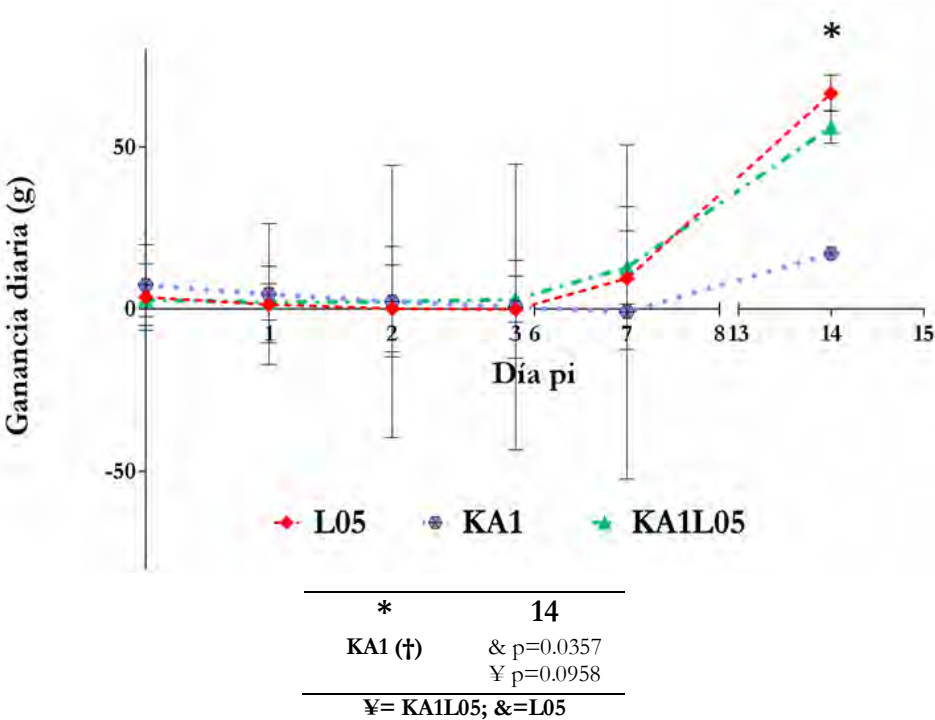


Figura 3.31 Evaluación del peso corporal. Arriba: Ganancia de peso a lo largo del experimento. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas de acuerdo con el test de medidas repetidas. Los datos se expresan como Media \pm SEM. *P<0,05.

3.2.2.3. Pruebas comportamentales

3.2.2.3.1. Sensibilidad al calor

El grupo KA1 mostró el mayor tiempo de latencia a lo largo de casi todo el experimento, mientras que los grupos L05 y KA1L05 se comportaron de forma muy similar para todos los días pi (**Fig. 3.32**). El tiempo de latencia del grupo KA1 fue significativamente diferente al de los grupos L05 y KA1L05, para todos los días pi.

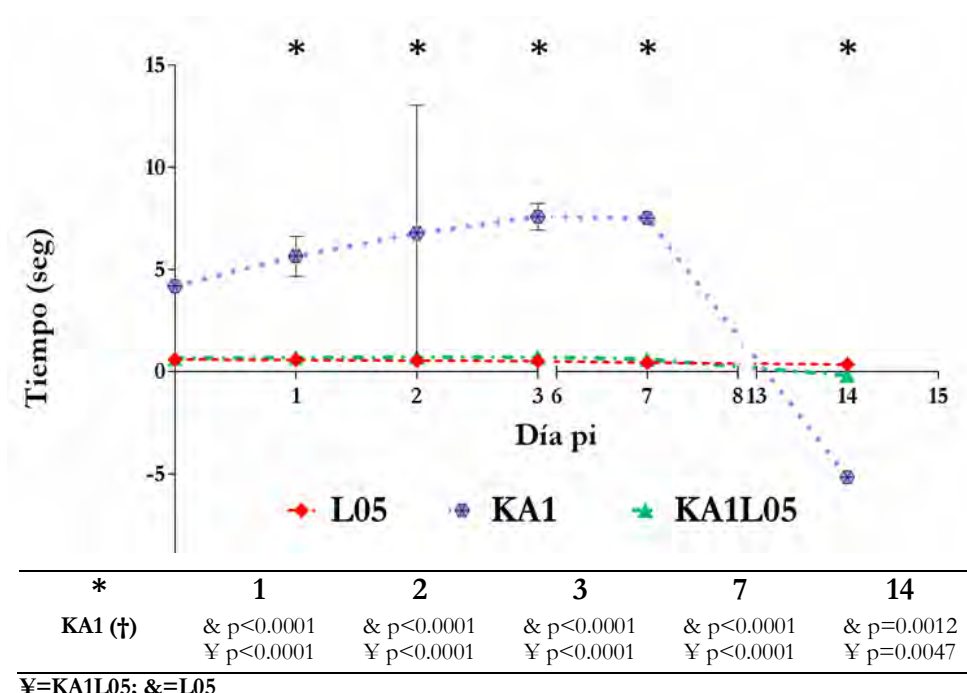


Figura 3.32 Prueba de sensibilidad al calor. Arriba: Tiempo de latencia (en seg) en función del día pi. Abajo: Tabla de diferencias significativas de acuerdo con el test de medidas repetidas. Los datos se expresan como Media \pm SEM. *P<0,05.

3.2.2.3.2. Suspensión en el aire

Los tiempos de suspensión de los animales pertenecientes al grupo KA1L05 fueron significativamente más largos que los de los grupos KA1 y L05 en los días 1, 2, 3 y 7 pi (**Fig. 3.33**). A su vez, el grupo KA1 mostró un tiempo de suspensión significativamente menor al de los animales del grupo L05, para los días 1 y 2 pi.

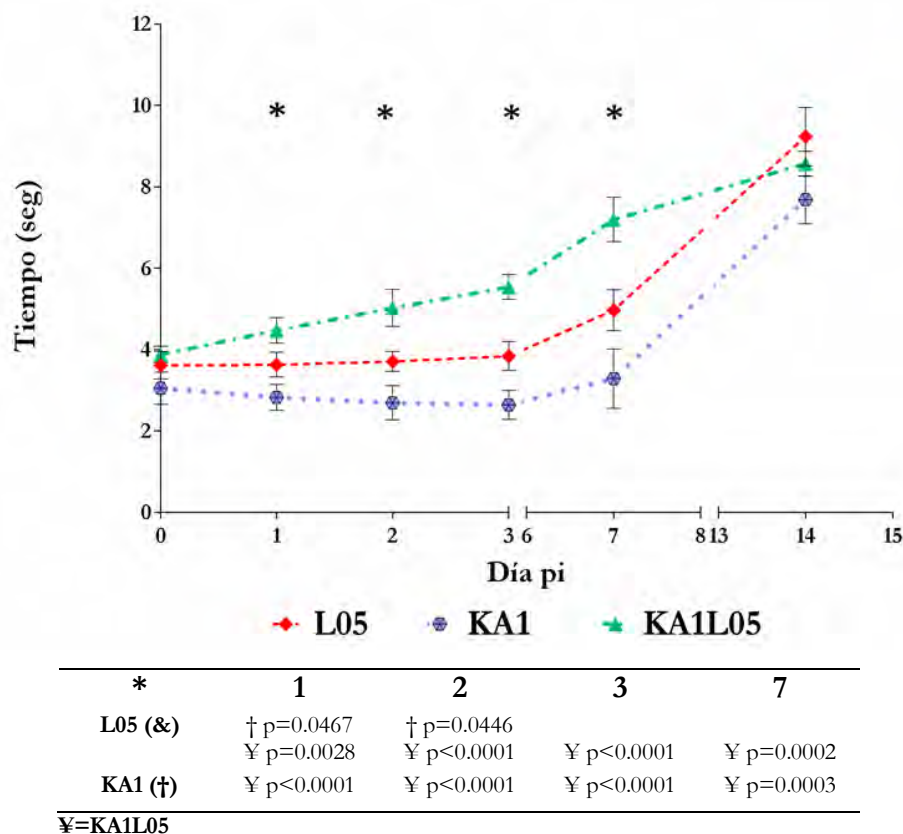


Figura 3.33 Prueba de suspensión en el aire. Arriba: tiempo de suspensión en el aire (en seg) en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas de acuerdo con el test de medidas repetidas. Los datos se expresan como Media \pm SEM. *P<0,05.

3.2.2.3.3. Desplazamiento en escalera horizontal

La cantidad de pasos promedio para cada grupo se graficó en función del día pi (**Fig. 3.34**). La cantidad de pasos de los grupos KA1 y KA1L05 disminuyó a partir del día 1 pi, con su valor mínimo al día 3 pi y recuperando sus valores hacia el día 14 pi.

Los pasos totales para cada grupo se desglosaron a su vez en las diferentes categorías, para todos los días pi (**Fig. 3.35**). Para todos los grupos en todos los días pi y para ambos miembros, la mayor proporción de pasos correspondió a la categoría 6. El resto de los pasos se distribuyeron, mayoritariamente, entre las categorías 5, 4 y 3, para todos los días pi y en ambos miembros. El grupo KA1 registró, además, pasos en las categorías 1 y 2 en el día 1 pi y en la categoría 1 en el día 2 pi, para el miembro ipsilateral.

En cuanto al análisis del porcentaje de errores registrados para cada grupo a lo largo de los días, el efecto del tratamiento del grupo KA1 fue significativo en comparación con los otros dos grupos, KA1L05 y L05, para el lado ipsilateral (**Fig. 3.36**). Para el lado contralateral, se hallaron diferencias significativas entre el tratamiento del grupo L05 en comparación con los otros dos grupos. De acuerdo con lo expuesto en la sección 2.16, para esta prueba el límite de significación fue $P < 0,10$.

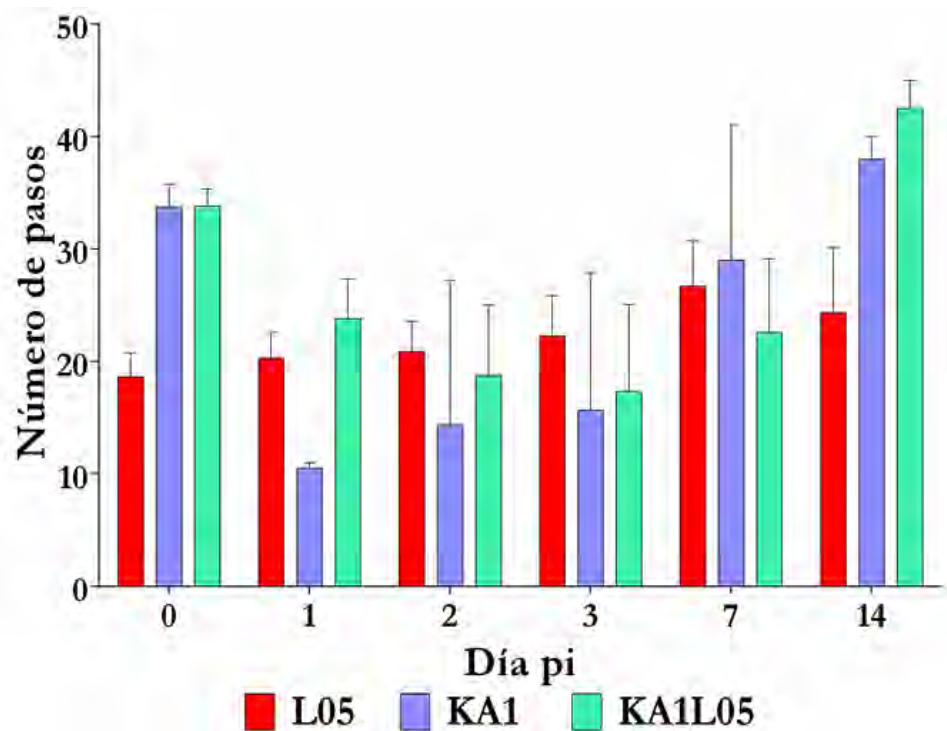


Figura 3.34 Cantidad promedio de pasos por grupo en función del día pi. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

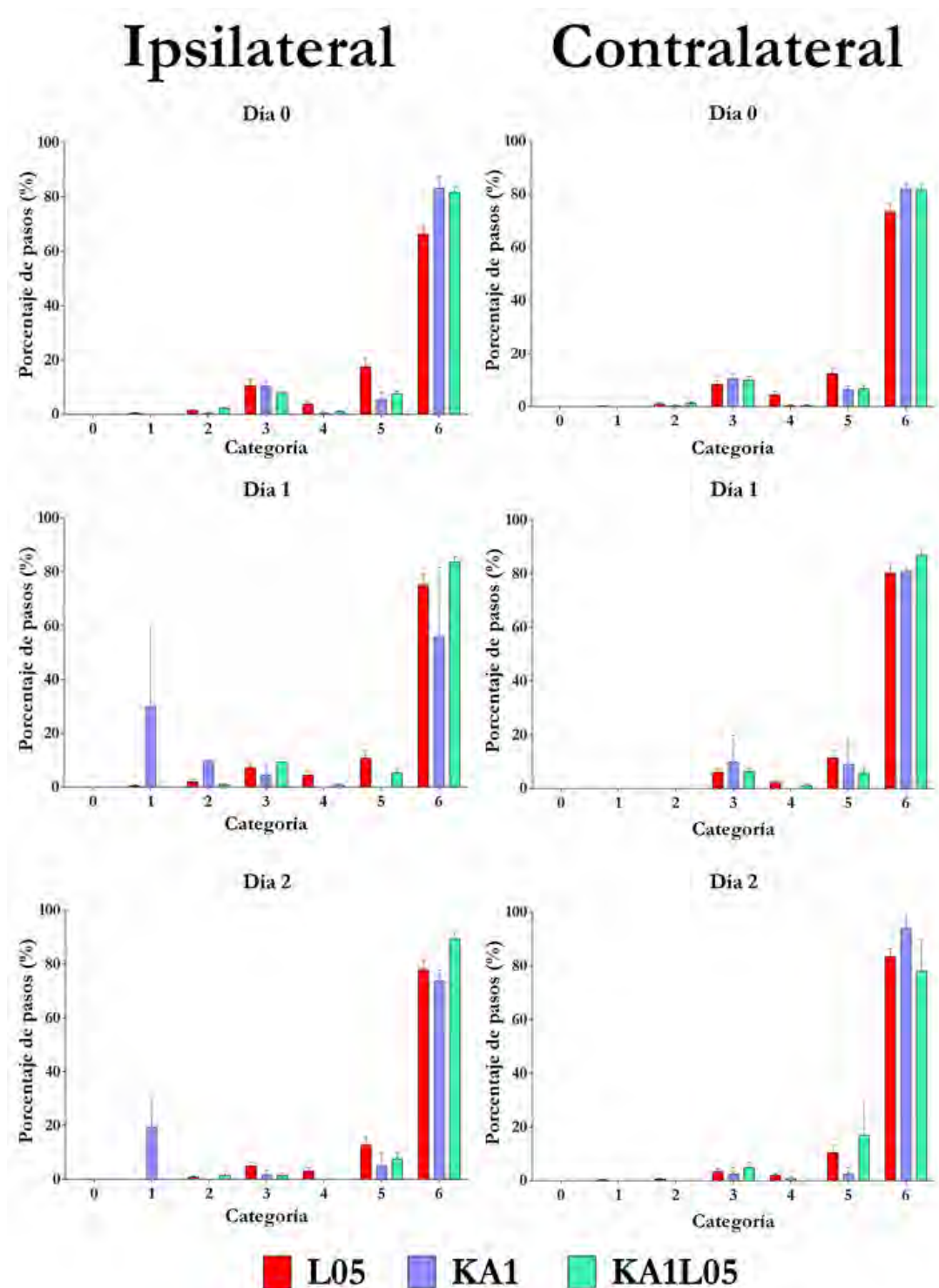


Figura 3.35 Pasos de los diferentes grupos distribuidos en las diferentes categorías. Los pasos de cada categoría se expresan como porcentaje del total de pasos. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

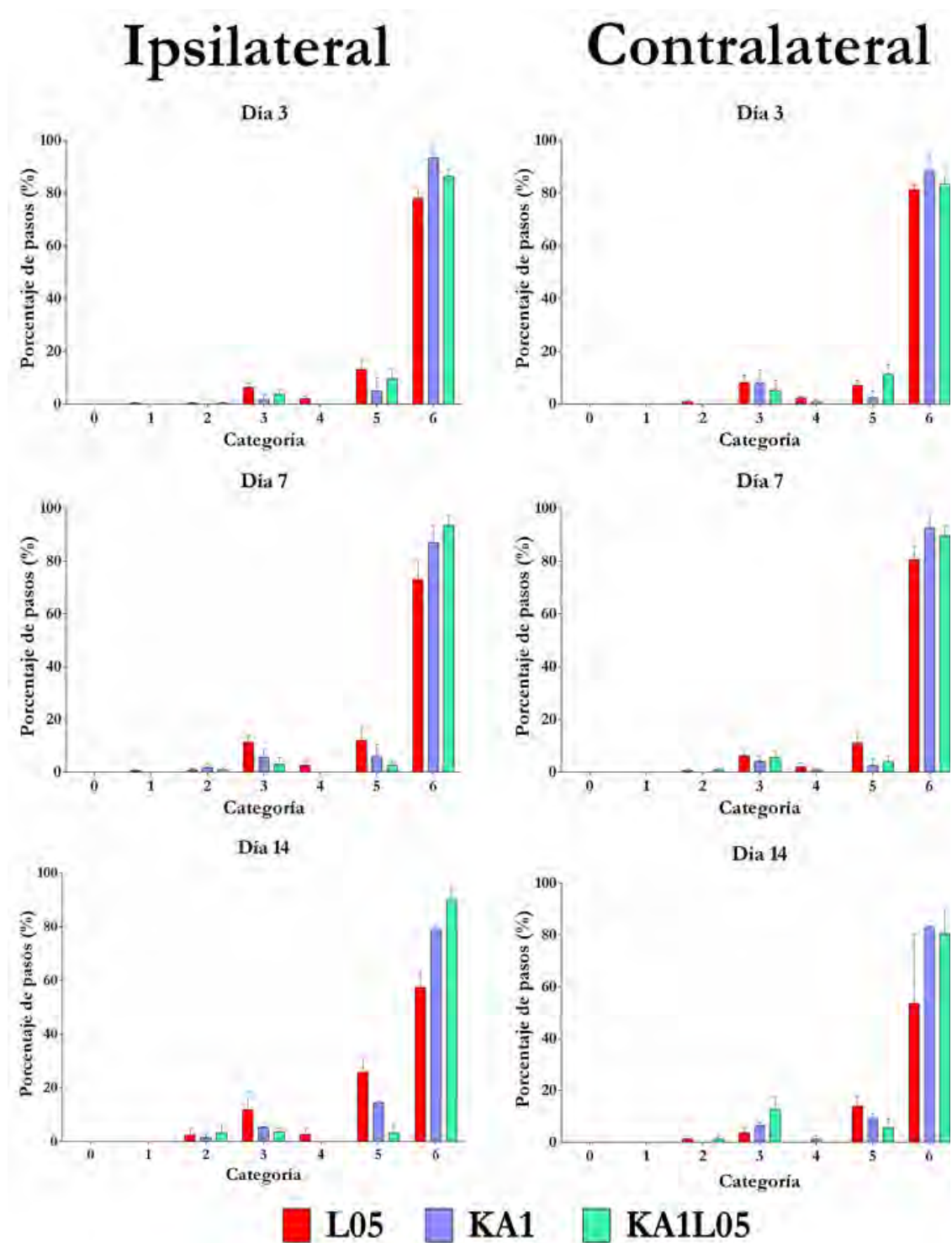


Figura 3.35 (continuación). Pasos de los diferentes grupos distribuidos en las diferentes categorías. Los pasos de cada categoría se expresan como porcentaje del total de pasos. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

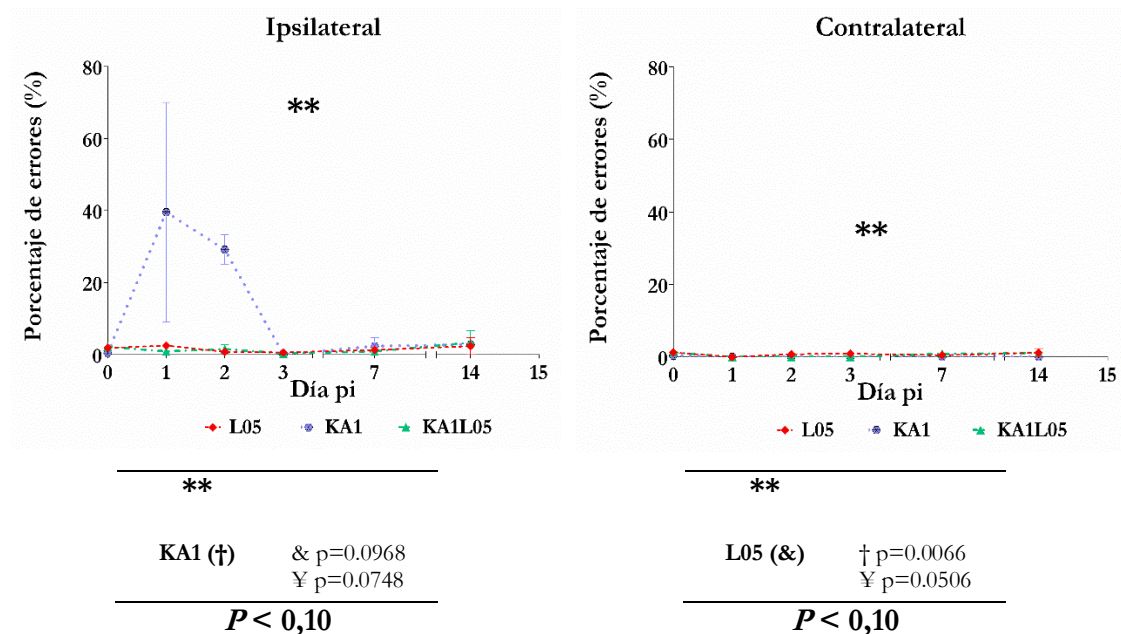


Figura 3.36 -Arriba: Gráfico de porcentaje de errores en función de días pi para el miembro ipsilateral. **Abajo:** Tablas de significancias. Datos expresados como Media \pm SEM, $**P < 0,10$.

-Arriba: Gráfico de porcentaje de errores en función de días pi para el miembro contralateral. **Abajo:** Tablas de significancias. Datos expresados como Media \pm SEM, $**P < 0,10$.

3.2.2.4. Histoquímica

El análisis histopatológico de las secciones del segmento C5 de los animales de los grupos KA1L05 y KA1 mostraron infiltración de células polimorfonucleares y áreas hemorrágicas coincidentes con el sitio de inyección (**Fig. 3.37**). Se observó un reducido número de neuronas en el lado ipsilateral de las secciones pertenecientes al grupo KA1, principalmente en la región ventral, mientras que el grupo KA1L05 mostró un patrón similar al presentado por L05 y los grupos *sham* y control (sección 3.1.2). Del lado contralateral, las neuronas permanecieron intactas y mostraron un aspecto similar al de los grupos control y *sham*, independientemente del tratamiento recibido.

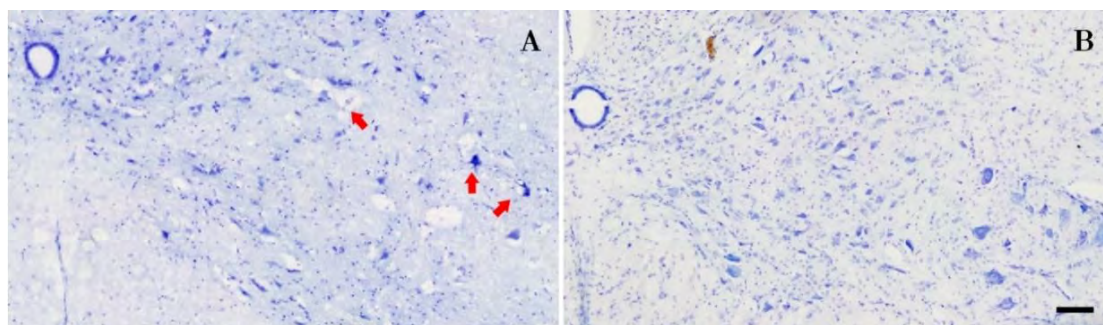


Figura 3.37 Aspecto histológico de secciones del segmento C5 pertenecientes a los grupos KA1 (**A**) y KA1L05 (**B**). Se muestra para ambos grupos la región ventral del lado ipsilateral, para el día 2 pi. En el grupo KA1, se observan menos motoneuronas que en el grupo KA1L05. Las motoneuronas restantes se observan contraídas o con citoplasma vacuolado. Barra = 100 μ m.

3.2.2.4.1. Identificación de mielina

Las secciones correspondientes al grupo KA1 mostraron alteraciones en la hemimédula ipsilateral, producidas por la pérdida de la sustancia gris (neuronas y sus proyecciones axonales) (**Fig. 3.38**). Las secciones correspondientes al grupo KA1L05, en cambio, no mostraron dichas alteraciones y se observaron similares a las del grupo *sham*.

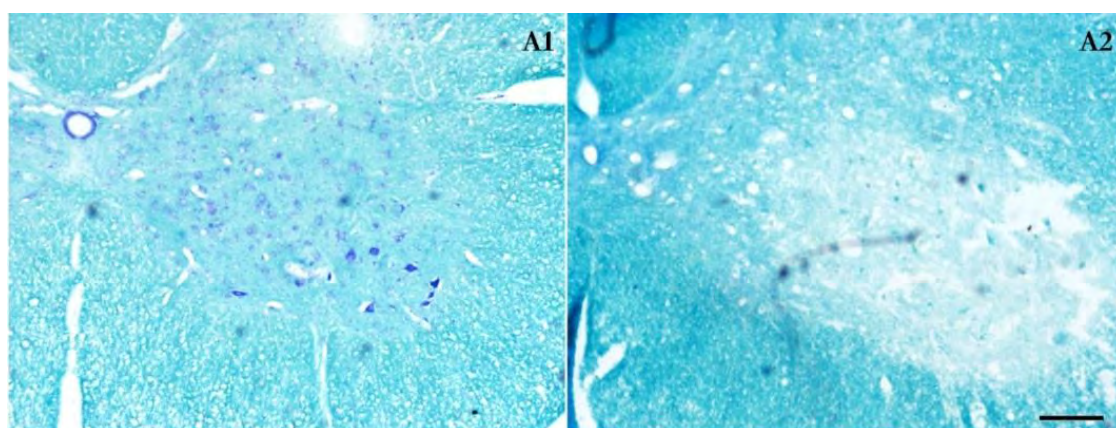


Figura 3.38 Identificación de mielina usando doble tinción con *Luxol Fast Blue* y violeta de cresilo. **A1**-Región ipsilateral correspondiente al grupo KA1L05, en el día 1 pi **A2**-Región ipsilateral correspondiente al grupo KA1, en el día 2 pi. Barra: 200 μ m.

3.2.2.5. Inmunohistoquímica

3.2.2.5.1. Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN

La marcación inmunohistoquímica con NeuN del grupo KA1, evidenció escasas neuronas en el lado ipsilateral, fundamentalmente en la región ventral (**Fig. 3.39**), mientras que el lado contralateral se mantuvo sin cambios aparentes. En las secciones correspondientes al grupo KA1L05 no se apreciaron cambios aparentes en ambas hemimédulas, sin pérdida apreciable de neuronas.

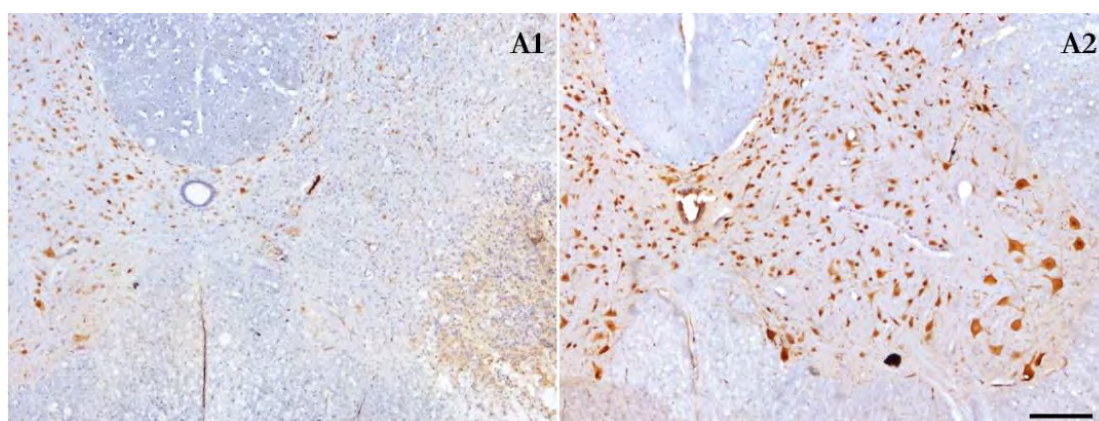


Figura 3.39 Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN. Se muestran las regiones ipsilaterales correspondientes a los grupos KA1 (**A1**) y KA1L05 (**A2**), ambas en el día 7 pi. Se observa la pérdida de neuronas en la región ventral de la sección correspondiente al grupo KA1, mientras que no se observan alteraciones para el grupo KA1L05. Barra: 200 μ m.

3.2.2.5.2. Identificación y determinación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP

La tinción con el anticuerpo anti-GFAP permitió observar la presencia de astrocitos distribuidos por toda la sección medular con mayor abundancia en la sustancia gris con respecto a la sustancia blanca (**Fig. 3.40**).

La marcación inmunohistoquímica con GFAP mostró que los animales del grupo KA1 incrementaron su área inmunomarcada ipsilateral, en comparación con los animales de los grupos L05 y KA1L05, en los días 1 pi ($P = 0.0435$) y 3 pi ($P = 0.0235$). Para el lado contralateral, el área inmunomarcada del grupo

KA1 fue significativamente mayor que las de los grupos L05 y KA1L05, en el día 3 pi ($P = 0,0345$) (**Fig. 3.41**).

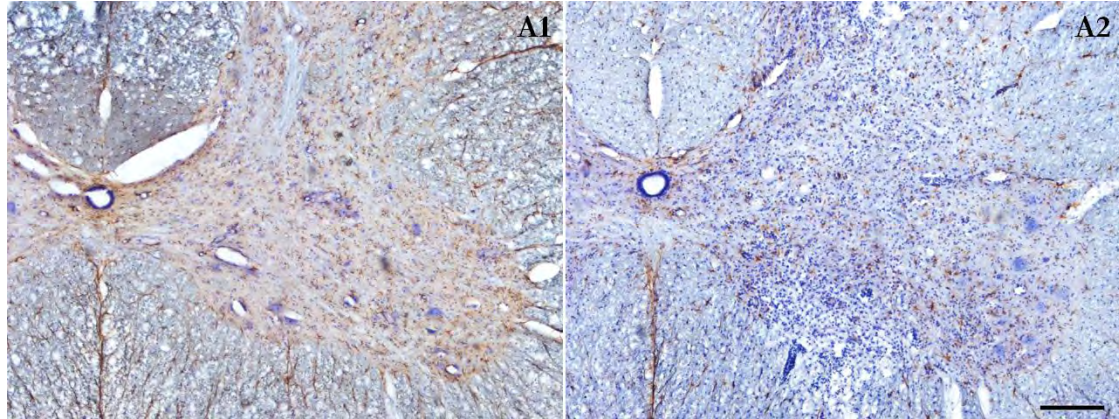


Figura 3.40 Identificación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP. Se muestran las regiones ipsilaterales correspondientes a los grupos KA1 (**A1**) y KA1L05 (**A2**), ambas en el día 3 pi. Barra: 200 μm .

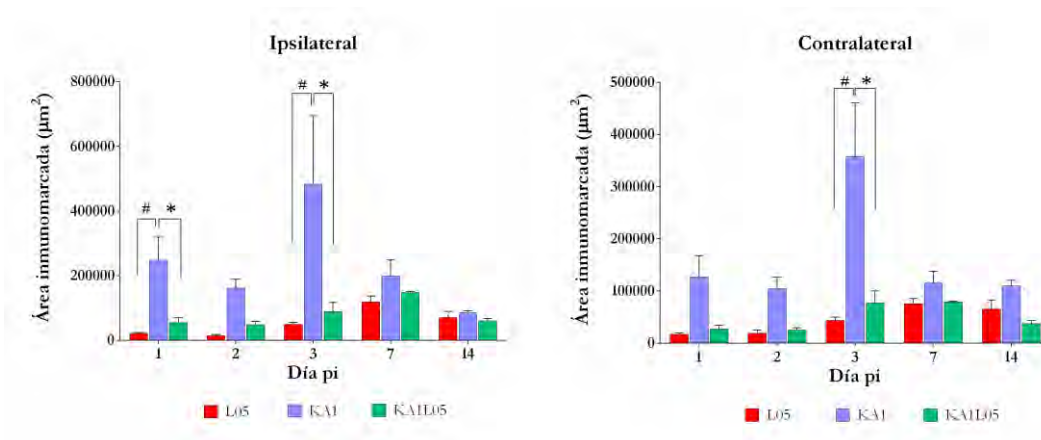


Figura 3.41. Área inmunomarcada con GFAP para los diferentes grupos, en función del tiempo, para las hemimédulas ipsilateral y contralateral. # KA1 *vs.* L05; * KA1 *vs.* KA1L05. Los datos se expresan como Media \pm SEM; * $P < 0,50$.

3.2.2.5.3. Identificación y determinación de neurofilamentos mediante el anticuerpo anti-NF

En las secciones procesadas por inmunohistoquímica para el anticuerpo anti-NF, la tinción mostró características similares a las descritas previamente en la

sección 3.1.3.3 (**Fig. 3.42**). En secciones correspondientes al grupo KA1L05, se evidenció marca en somas neuronales de la región ventral ipsilateral para el día 14 pi.

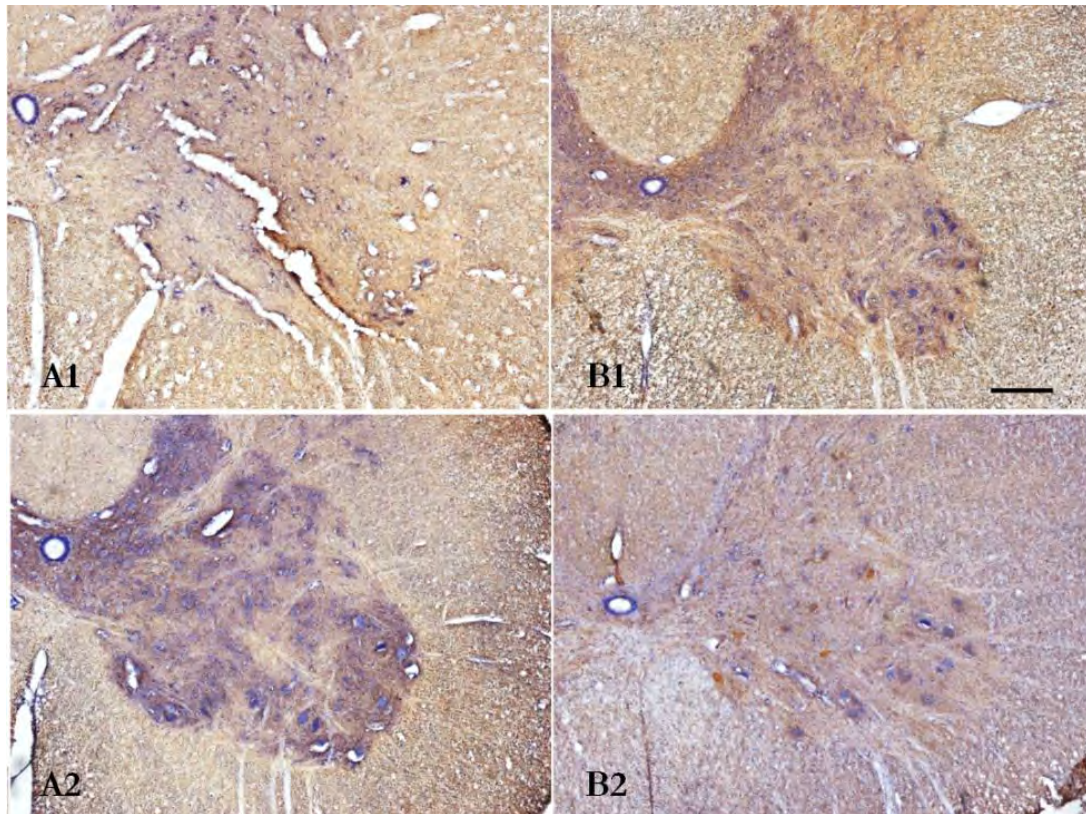


Figura 3.42. Identificación de neurofilamentos (NF). **A1 y B1-** Secciones ipsilaterales pertenecientes al grupo KA1, en los días 1 y 14 pi, respectivamente. **A2 y B2-** Secciones ipsilaterales pertenecientes al grupo KA1L05, en los días 1 y 14 pi, respectivamente. Barra: 200 μ m.

En la hemimédula ipsilateral, el grupo KA1 presentó menor área inmunomarcada en la sustancia blanca, en comparación con el grupo KA1L05, tanto para el día 1 pi, como al día 14 pi (**Fig. 3.43**), mientras que el porcentaje de marca positiva en la sustancia gris no mostró cambios aparentes. El área inmunomarcada de la sustancia blanca del grupo KA1L05, fue mayor con respecto al de los grupos KA1 y L05, en ambos días pi y en ambas hemimédulas. Ese porcentaje se incrementó al día 14 pi, en comparación con el día 1 pi.

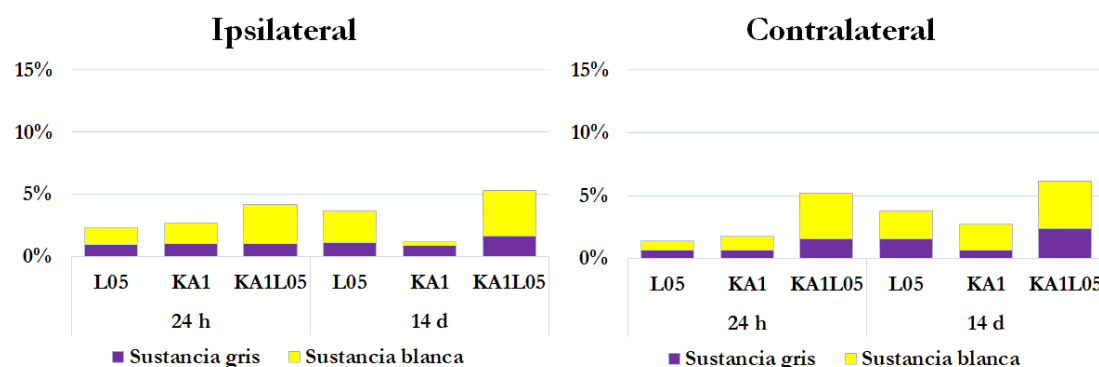


Figura 3.43. Distribución porcentual de la marca de NF en secciones del segmento C5 para los grupos L05, KA1 y KA1L05. El área positiva para NF en las sustancias gris y blanca, se expresa como porcentaje del área total en cada hemimédula.

3.2.2.6. Inmunofluorescencia

3.2.2.6.1. GFAP+PCNA

Las secciones correspondientes a todos los grupos mostraron marca positiva para GFAP, con mayor abundancia en la sustancia gris. En el grupo KA1 fue posible advertir diferencias en la marca para DAPI entre las hemimédulas, con una mayor cantidad de células del lado contralateral (**Fig. 3.44**). En el grupo KA1L05, no se apreciaron diferencias referentes a la cantidad de células en ambas hemimédulas, mientras que algunos de los astrocitos marcados positivamente con el anticuerpo anti-GFAP expresaban también PCNA (**Fig. 3.45**).

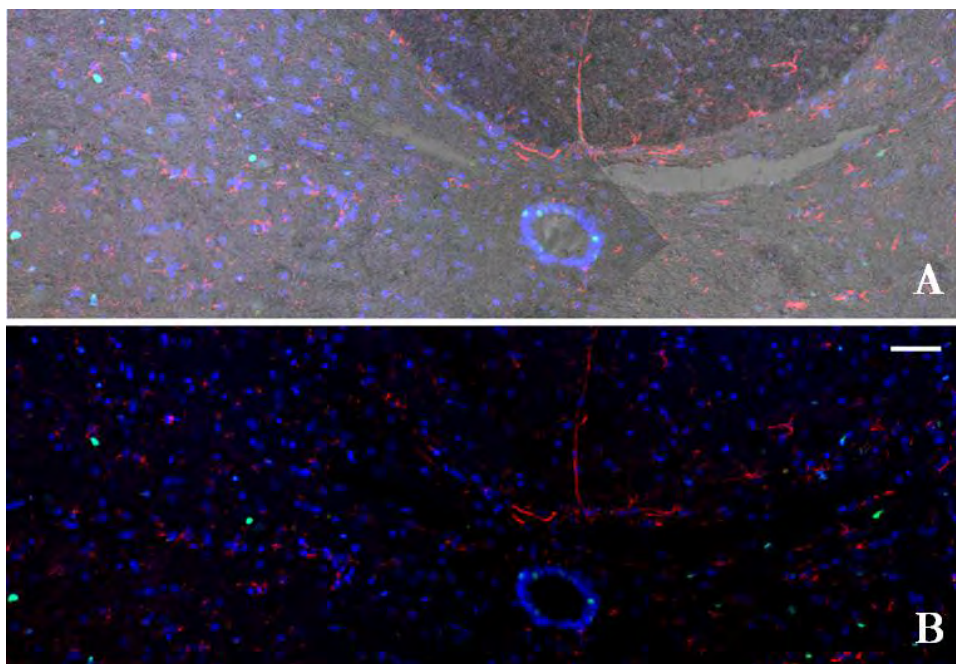


Figura 3.44. A. Imagen confocal de las Láminas IV y X del grupo KA1 mostrando la presencia de células GFAP (rojo) y PCNA (verde) positivas. B: superposición del canal DIC (Contraste de Interferencia Diferencial) sobre la imagen A. Barra: 50 μm .

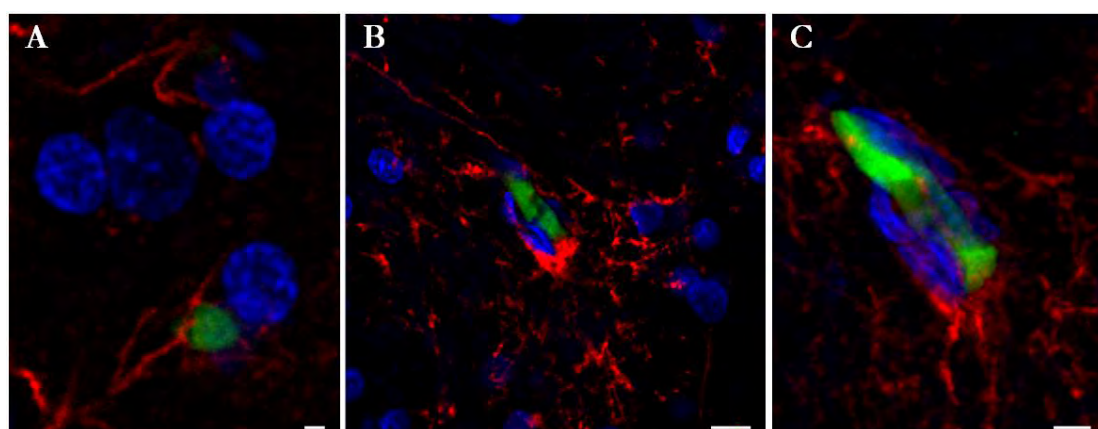


Figura 3.45. Imágenes correspondientes al grupo KA1L05, donde se observan astrocitos (en rojo) que expresan PCNA (verde) al día 1 pi (A) y a los 14 días pi (B y C). Barras: 2, 10 y 5 μm respectivamente.

3.2.2.6.2. Representación 3D de la tinción inmunofluorescente

Las secciones gruesas de los segmentos cervicales se procesaron mediante la técnica de CLARITY, para la obtención de imágenes 3D.

El uso de esta técnica permitió la observación al microscopio confocal de secciones ópticas de hasta aproximadamente 100 μm , en contraposición con las técnicas de rutina que en promedio permiten una profundidad de imagen de hasta 20 μm . A continuación, se presenta una selección de imágenes mostrando 2 de los 3 canales utilizados (GFAP-DAPI o NF-DAPI) para una mejor apreciación de la distribución de las células positivas a cada uno de los anticuerpos.

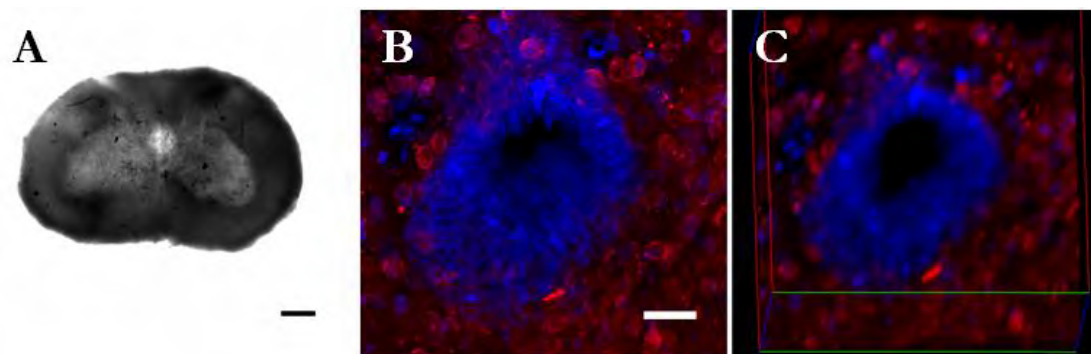


Figura 3.46. **A.** Imagen DIC del segmento C5 de la médula espinal del grupo *sham* luego de su procesamiento mediante la técnica de CLARITY. Barra = 500 μm . **B.** Región del canal central de la médula espinal (Lámina X) mostrando las células del tejido endimario (azul) rodeadas por células positivas a GFAP (rojo). **C.** Proyección 3D de la misma región para apreciar la profundidad del seccionamiento óptico. Barra para **B** y **C** = 50 μm .

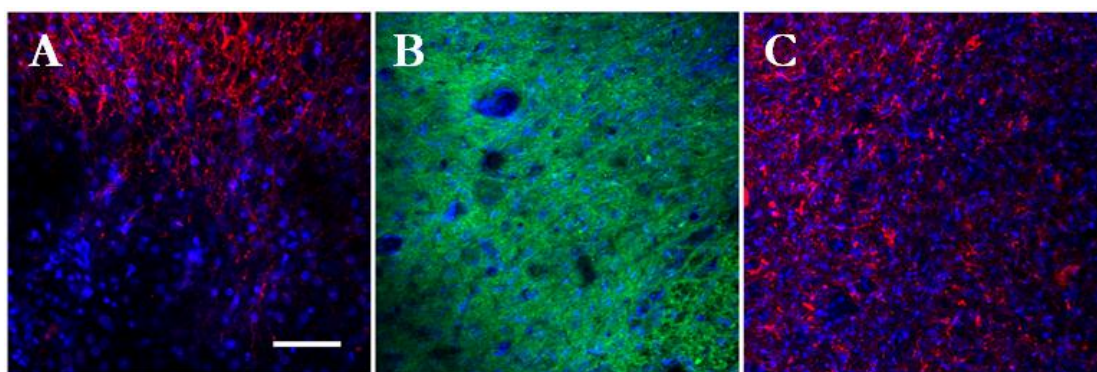


Fig. 3.47. Imágenes confocales del segmento C5 procesado mediante la técnica de CLARITY que muestran la distribución de células GFAP positivas (rojo) en el grupo KA1 (**A**), neurofilamentos (verde) (**B**) y GFAP (**C**) en el grupo KA1L05. Todos los grupos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Barra = 100 μm .

3.2.2.6.3. Fluoro-Jade

La tinción con Fluoro-Jade B permitió evidenciar marcación positiva en células en las hemimédulas ipsilaterales de los grupos KA1 y KA1L05, en los días 1 y 2 pi, respectivamente (**Fig. 3.48**). No se observaron marcas positivas al fluoro-Jade del lado contralateral.

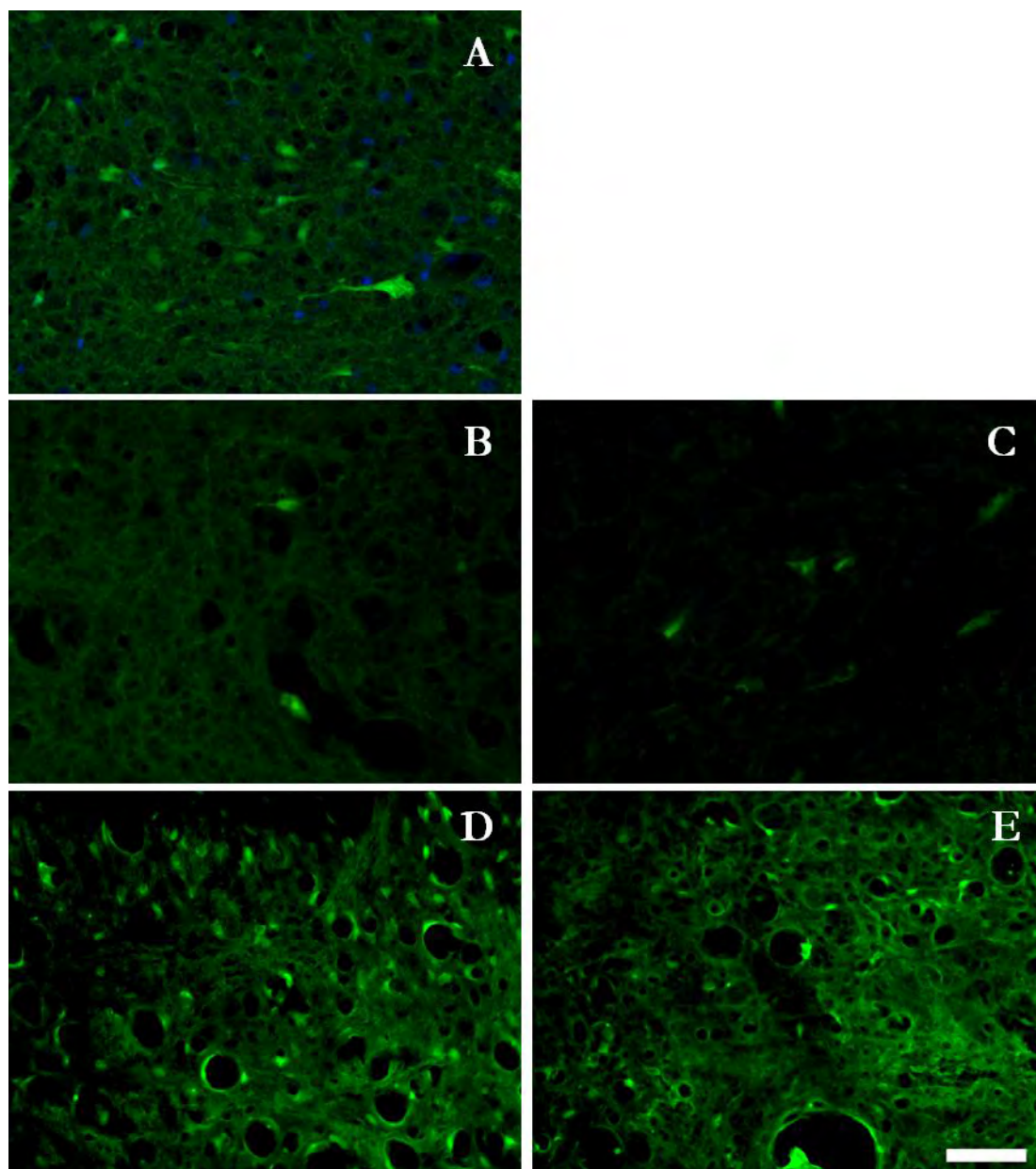


Figura 3.48. Sectores de la región ventral, en secciones del grupo KA1, en el día 1 pi, donde se observa la presencia de células con marcación positiva a Fluoro-Jade B y DAPI (**A**), a Fluoro-Jade B (**B** y **C**). Sectores de la región ventral de secciones del grupo KA1L05 teñidas con fluoro-Jade B, para el día 2 pi (**D** y **E**). Barra: 50 μ m.

3.2.2.7. Análisis Morfométrico

La comparación de las áreas transversales de ambos lados de las secciones C5 mostró un incremento significativo del área ipsilateral para los animales del grupo KA1 en comparación con el grupo L05, en el día 1 pi ($P = 0,0077$) (**Fig. 3.49**). No se observaron diferencias significativas entre el área de las secciones contralaterales, de los grupos, a lo largo del experimento.

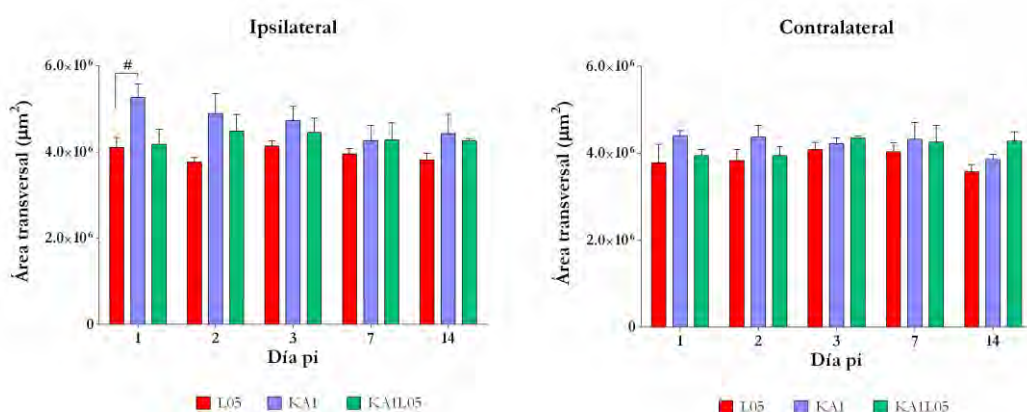


Figura 3.49 Gráficos de área transversal de las hemimédulas en función del día pi. # KA1 *vs.* L05. Los datos se expresan como Media \pm SEM; # $P < 0,50$.

El recuento neuronal basado en la tinción con violeta de cresilo se llevó a cabo para ambos lados de las secciones cervicales, ipsilateral y contralateral. No se encontraron diferencias significativas en el número total de neuronas para los grupos KA1L05 y L05, mientras que el grupo KA1 mostró una disminución significativa en el número total de neuronas del lado ipsilateral, en comparación con los otros grupos, en los días 1 pi ($P = 0,0005$), 2 pi ($P = 0,0079$), 3 pi ($P = 0,0090$) y 7 pi ($P = 0,0023$) (**Fig. 3.50**). No se hallaron diferencias para el lado contralateral para ninguno de los días pi y entre ninguno de los grupos.

Se realizó, también, la estimación del número total de neuronas para todo el segmento C5 y se hallaron diferencias significativas para el grupo KA1 en comparación con los grupos restantes, en los días 1 pi ($P = 0,0024$) y 3 pi ($P = 0,0076$) y contra el grupo KA1L05, al día 7 pi ($P < 0,0001$) (**Tabla 3.2**). No se

registraron diferencias significativas en el número total de neuronas por segmento para el lado contralateral.

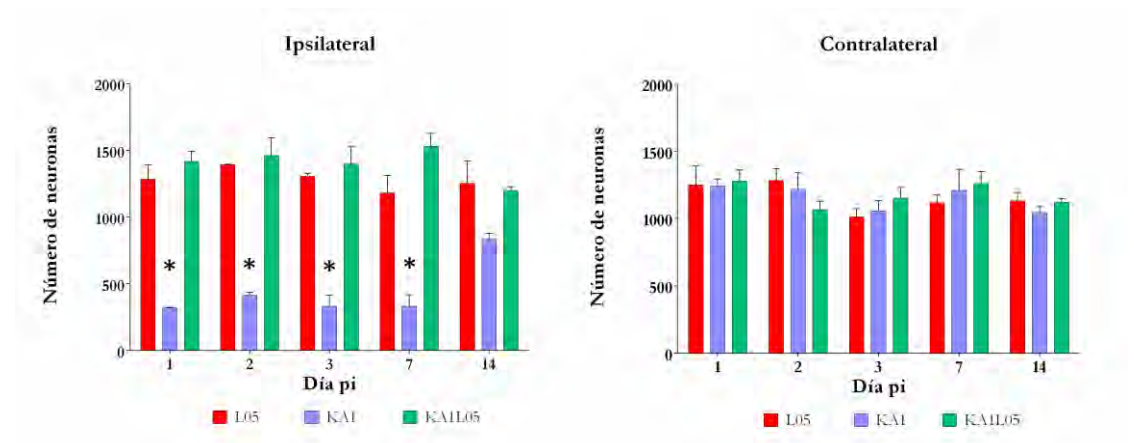


Figura 3.50 Recuento neuronal en el segmento C5. * KA1 *vs.* L05 y KA1L05. Los datos se expresan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

Día pi ^a	L05	KA1	KA1L05
1	248100 \pm 19919	114300 \pm 15500*	288400 \pm 12154
2	267700 \pm 9200	127700 \pm 12400	255525 \pm 17456
3	233950 \pm 12150	115800 \pm 5000*	266600 \pm 20061
7	227800 \pm 3500	103900 \pm 11400*	279167 \pm 23354
14	238550 \pm 23050	107750 \pm 7550	228167 \pm 5664
Día pi ^b	L05	KA1	KA1L05
1	229300 \pm 16800	227200 \pm 18300	231900 \pm 24300
2	244500 \pm 21600	220400 \pm 23900	226900 \pm 11900
3	240760 \pm 32400	223000 \pm 18000	235900 \pm 15700
7	233950 \pm 15700	222800 \pm 31400	241300 \pm 22200
14	245320 \pm 15800	221200 \pm 13700	238600 \pm 21400

Tabla 3.2. Recuento estimado por segmento, para la hemimédula ipsilateral^a, y contralateral^b. Los datos se presentan como Media \pm SEM. * $P < 0,05$

El recuento neuronal basado en la tinción de violeta de cresilo también se llevó a cabo para los segmentos C4 y C6 (**Fig. 3.51**). No se hallaron diferencias significativas entre el número de neuronas de los diferentes grupos, en ninguno

de los días pi y en ambas hemimédulas, tanto para el segmento C4 como para el segmento C6.

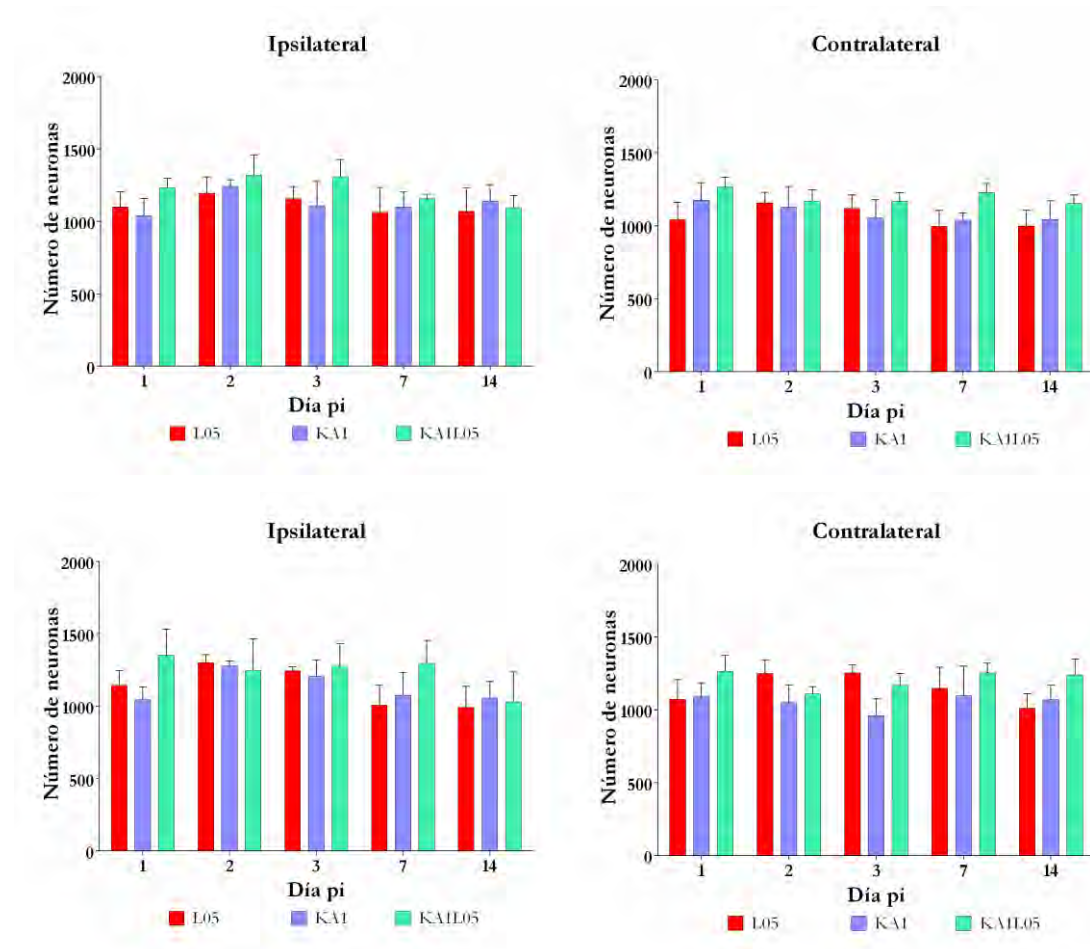


Figura 3.51 Recuento neuronal en los segmentos C4 (arriba) y C6 (abajo), para las hemimédulas ipsilaterales (izquierda) y contralaterales (derecha). No se hallaron diferencias significativas. Todos los valores se expresan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Al igual que lo realizado en la etapa 1, la evaluación de los parámetros morfométricos se llevó a cabo sobre la sustancia gris dividida en 3 regiones: dorsal, central y ventral, para cada hemimédula. Como fuera mencionado en la sección 3.1.5., en estos animales, la descarga de la inyección también tuvo lugar en la región media con principal influencia en la región ventral. Por lo tanto, a continuación, se detallan las variaciones de los parámetros morfométricos para

las poblaciones neuronales de esta región, haciendo posteriormente una descripción de las diferencias halladas en los otros dos sectores.

3.2.2.7.1. Región ventral

La comparación de las áreas neuronales mostró diferencias significativas entre los grupos, en los días 2, 3, 7 y 14 pi, en la hemimédula ipsilateral y para los días 1, 2, 7 y 14 pi, en la hemimédula contralateral (**Fig. 3.52**). El área promedio máxima para el grupo KA1 se observó al día 3 pi, en el lado ipsilateral y al día 2 pi, en el lado contralateral; mientras que para el grupo KA1L05, el área promedio máxima se registró en el día 14 pi para ambas hemimédulas, pero con un valor superior en el lado ipsilateral.

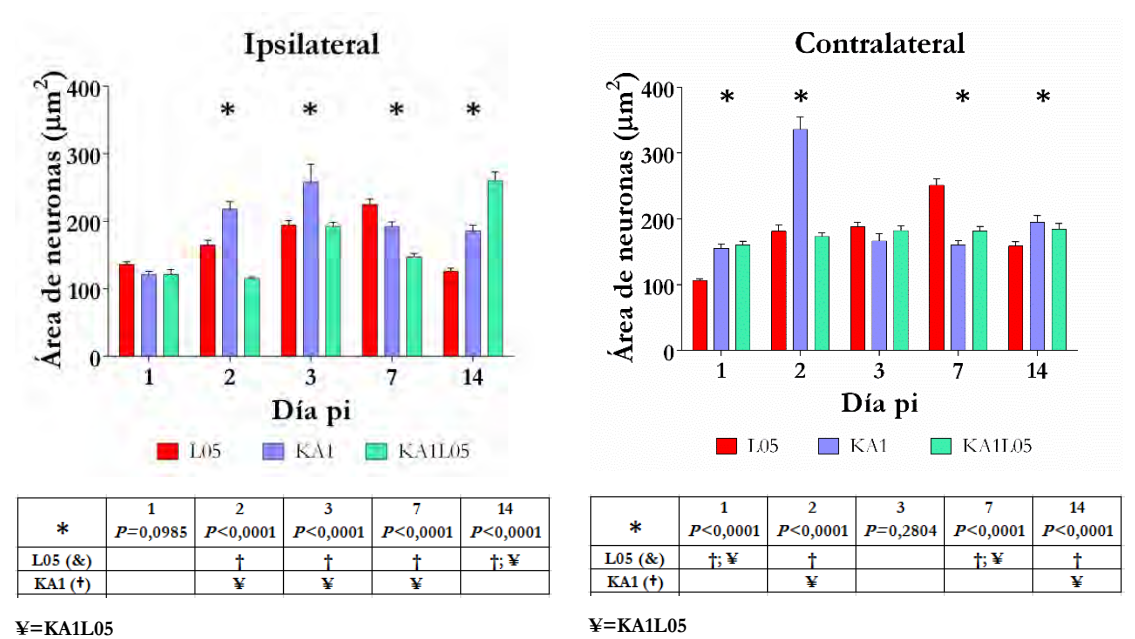


Figura 3.52 -Izquierda. Arriba: Área de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media ± SEM.

Derecha. Arriba: Área de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media ± SEM.

Para las neuronas de la región ventral, el gráfico de cajas y bigotes permitió apreciar una reducción inicial, tanto de la dispersión como del valor máximo del área de las neuronas del grupo KA1 (**Fig. 3.53**). La mediana y el valor máximo aumentaron en el día 2 pi; este comportamiento se mantuvo el día 3 pi. Para el día 7 pi, se observó un aumento de la mediana, y al mismo tiempo, también se observó una reducción del valor máximo. El mismo patrón se registró en el día 14 pi. Para el lado contralateral, la mayor variación se encontró en el día 2 pi con el aumento del tamaño de las neuronas y de la dispersión de los datos, tanto por debajo como por encima de la mediana.

En cuanto al grupo KA1L05, la distancia entre el primer y segundo cuartil se mantuvo relativamente estable, mientras que la dispersión de la parte superior de la caja tuvo variaciones a lo largo del experimento, pero dentro de un cierto rango. No se observaron variaciones para el lado contralateral.

La comparación del diámetro promedio de las neuronas mostró diferencias significativas entre los grupos para los días 2, 3, 7 y 14 en la hemimédula ipsilateral, y para todos los días pi en la hemimédula contralateral (**Fig. 3.54**). El diámetro promedio máximo del grupo KA1 se observó al día 3 pi, en el lado ipsilateral y al día 2 pi, en el lado contralateral. Para el grupo KA1L05 el diámetro promedio máximo se observó al día 14 pi para ambas hemimédulas; sin embargo, los valores fueron más constantes a lo largo de los días pi en el lado contralateral.

La comparación de los diámetros feret de los diferentes grupos mostró diferencias significativas entre los grupos para los días 2, 3, 7 y 14 pi en el lado ipsilateral, y para los días 1, 2, 7 y 14 en el lado contralateral (**Fig. 3.55**). Tanto el grupo KA1 como el grupo KA1L05 se comportaron según lo descrito para el parámetro anterior

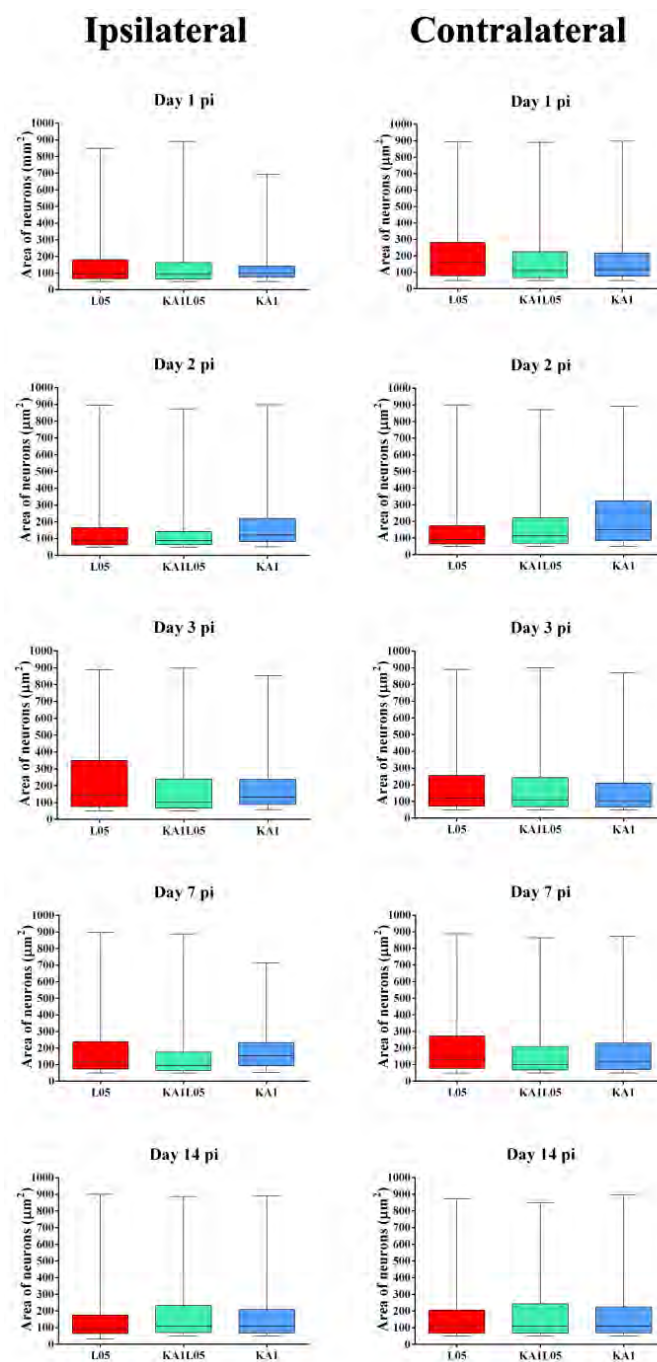


Figura 3.53. Representación mediante gráfico de cajas y bigotes del parámetro morfométrico área neuronal para la región ventral, por día pi y para ambas hemimédulas. El gráfico muestra la distribución de los tamaños neuronales mediante la representación gráfica de los cuartiles, la mediana y los valores mínimo y máximo para todos los grupos, por día pi y para ambas hemimédulas.

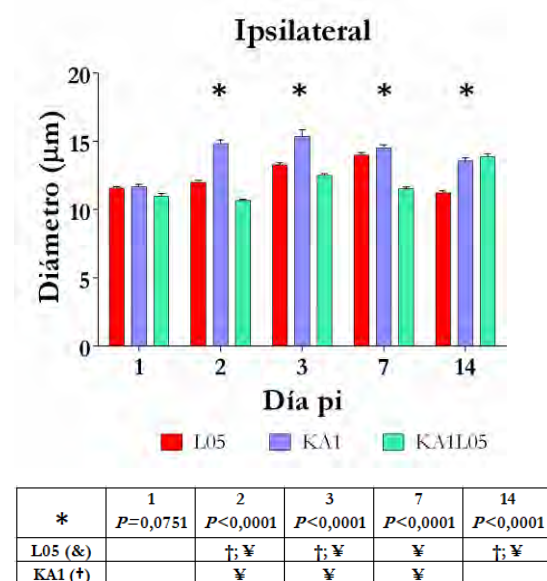
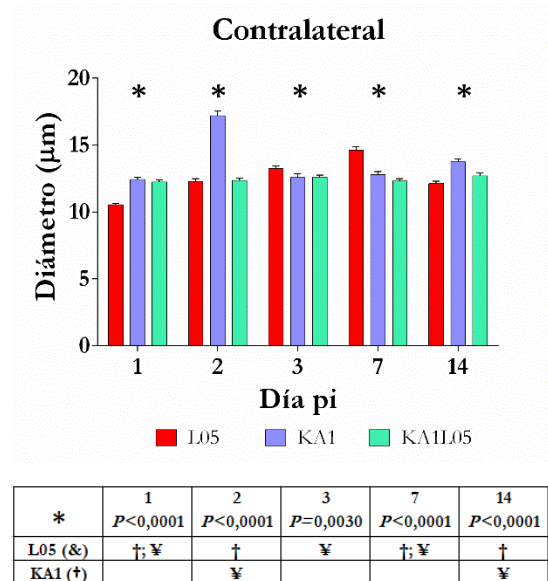


Figura 3.54 -Izquierda. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



Derecha. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

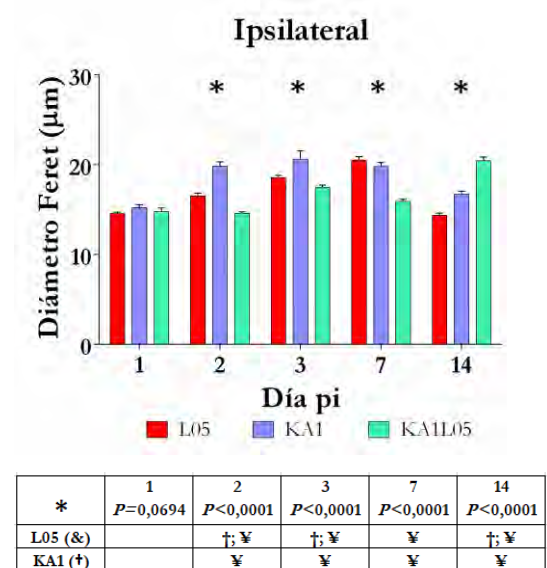
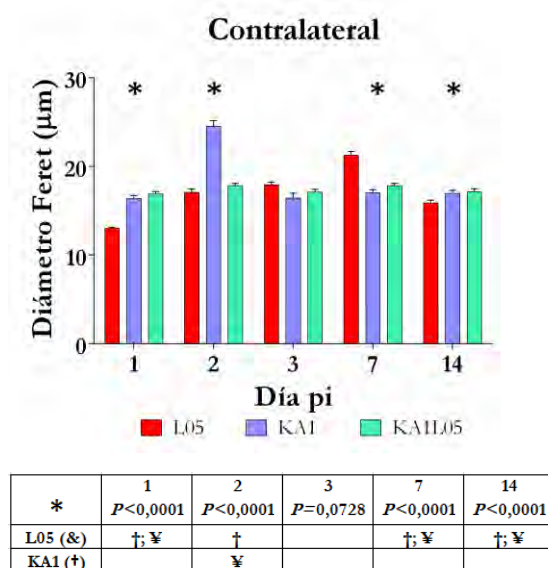


Figura 3.55 -Izquierda. Arriba: Diámetro feret de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



Derecha. Arriba: Diámetro feret de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Al considerar los perímetros de las neuronas, se hallaron diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. 3.56**). Las neuronas del grupo KA1 tuvieron un perímetro promedio máximo al día 3 pi en el lado ipsilateral y al día 2 pi, en el lado contralateral. El perímetro promedio máximo para el grupo KA1L05 se registró en el día 14 pi del lado ipsilateral y en el día 7 pi en el lado contralateral.

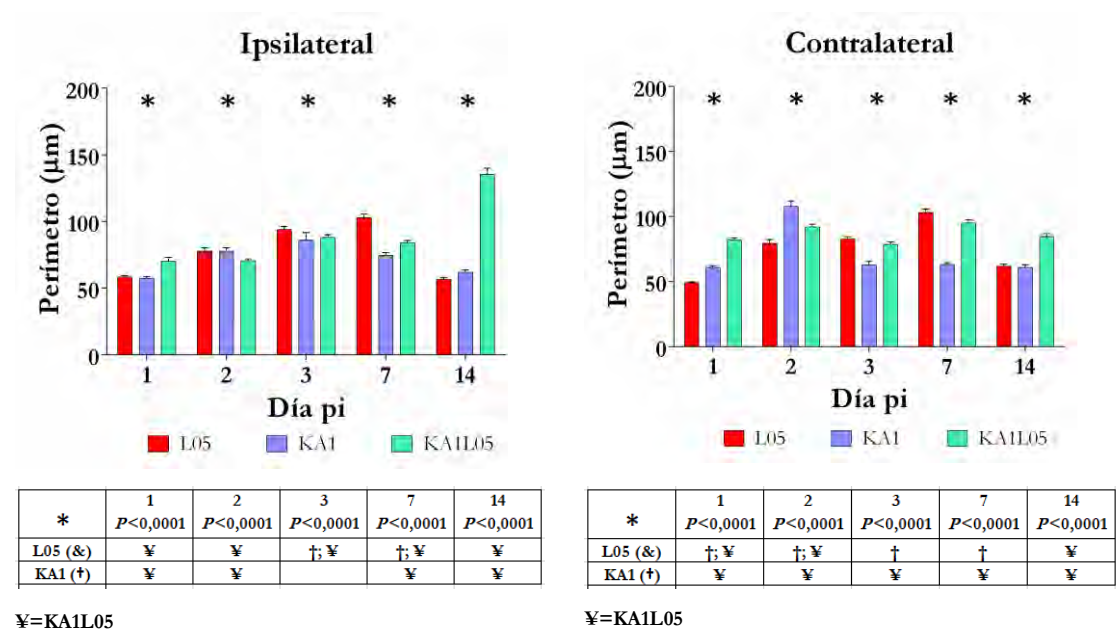


Figura 3.56 -Izquierda. Arriba: Perímetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Derecha. Arriba: Perímetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

En cuanto a la redondez neuronal, se hallaron diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. 3.57**). La redondez en el grupo KA1 se mantuvo en valores uniformes en los días 1, 2, 3 y 7 pi y mostró un leve descenso en el día 14 pi, para el lado ipsilateral. En el lado contralateral, el máximo se registró en el día 2 pi, y el resto de los días pi tuvieron valores similares. Para el grupo KA1L05, la redondez se incrementó

con el correr de los días, alcanzando su máximo al día 14 pi en el lado ipsilateral, mientras que del lado contralateral el máximo se observó en el día 7 pi.

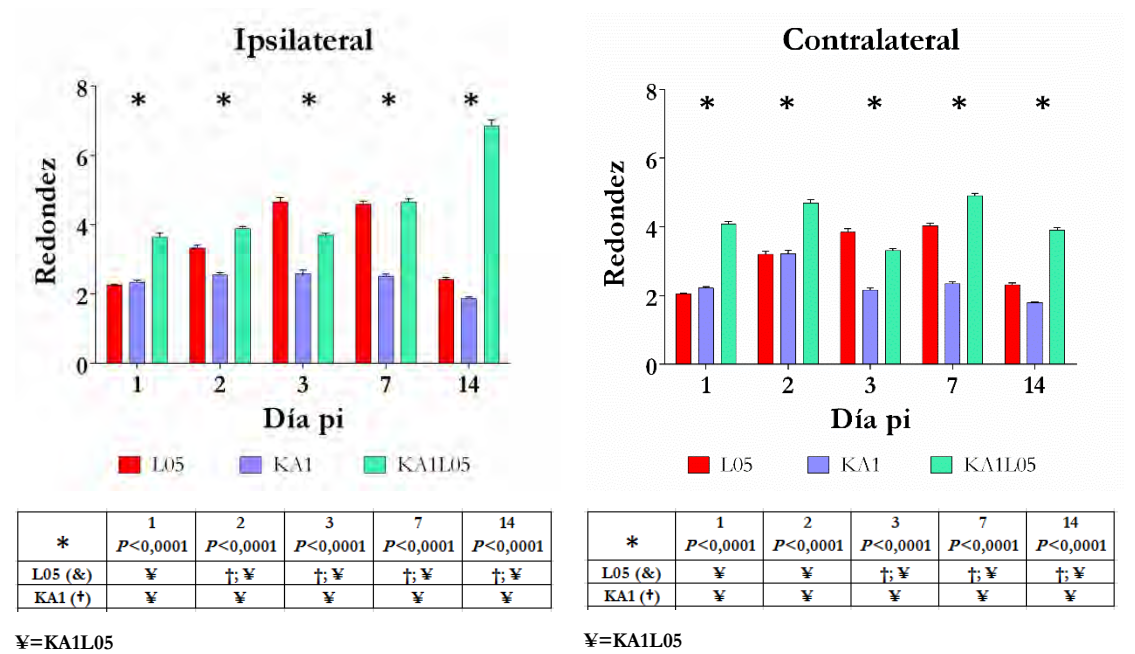


Figura 3.57 -Izquierda. Arriba: Redondez de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Derecha. Arriba: Redondez de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

3.2.2.7.2. Regiones dorsal y central

En la región dorsal, el grupo KA1 mostró los mayores valores para el parámetro área en ambas hemimédulas, mientras que el grupo KA1L05 mostró valores más parecidos a los del grupo L05. En cuanto al diámetro, el grupo KA1 tuvo valores mayores a los hallados para el grupo KA1L05 para ambas hemimédulas, mientras que el grupo KA1L05 mostró valores menores a los del grupo L05. Para los parámetros perímetro, redondez y diámetro feret se observó el mismo comportamiento con el grupo KA1, alcanzando valores máximos en los días 3 pi del lado ipsilateral y 2 pi del lado contralateral; el grupo KA1L05 mostró sus valores máximos en el día 1 pi en ambas hemimédulas.

En la región central, el grupo KA1 mostró un máximo al día 3 pi, en el lado ipsilateral y al día 2 pi, en el lado contralateral, mientras que el grupo KA1L05 presentó valores más uniformes a lo largo de los días pi. El grupo KA1 mostró el mismo comportamiento para los parámetros diámetro, perímetro, redondez y feret. Por su parte, el grupo KA1L05 tuvo su máximo diámetro al día 1 pi, los máximos perímetro y redondez al día 2 pi, para ambas hemimédulas y el máximo de su diámetro feret en el día 2 pi, para el lado ipsilateral y en el día 3 pi en el lado contralateral. Los gráficos para los diferentes parámetros por hemimédula y región, junto con los correspondientes datos estadísticos se presentan en el Anexo 1.

3.2.3. Inyección simultánea de lidocaína 1 % + KA 1 mM

A fin de evaluar si la acción atenuante de la excitotoxicidad producida por el KA1 se relacionaba, de alguna manera, con la concentración aplicada de lidocaína, se llevó a cabo un ensayo piloto, en el cual se inyectaron por vía intraparenquimatosa 5 µl de una solución mezcla de 1 mM KA y 1 % lidocaína, a nivel del segmento cervical C5.

Durante la cirugía, más precisamente durante la inyección, se produjo un efecto convulsivo y los animales murieron.

Debido a que ninguno de los animales superó la etapa de la cirugía, se decidió poner fin al esquema experimental inicialmente planteado para esta combinación de principios activos.

3.3. ETAPA 3: Tratamiento de la lesión inducida por KA mediante una inyección de lidocaína 0,5 %

3.3.1. Estado general y comportamiento motriz

Durante la inyección intraparenquimatosas de KA1, todos los animales exhibieron una contracción de los músculos extensores del miembro torácico derecho, hecho que fue considerado como un signo positivo de la inyección. Las ratas se recuperaron de la anestesia alrededor de 40-90 min después de la cirugía. Al despertar, los animales inyectados con KA1 mostraron distonía del miembro torácico derecho y exhibieron pérdida de apetito más allá del tiempo requerido para la recuperación post- anestésico (40-90 min) y por un tiempo no superior a 1-2 días.

Durante la inyección de 0,5 % lidocaína en la cisterna magna, no se observó ningún tipo de signo distintivo de toxicidad, y los animales se recuperaron de la anestesia dentro de los 30-40 min posteriores. Una vez despiertos, los animales no exhibieron decaimiento ni pérdida de apetito.

3.3.2. Evaluación del peso

Todos los animales redujeron su peso corporal luego de la inyección de KA1; esta reducción fue mayor en el caso del grupo *sham*-KA, en comparación con el grupo tratado, aunque no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos (**Fig. 3.58**).

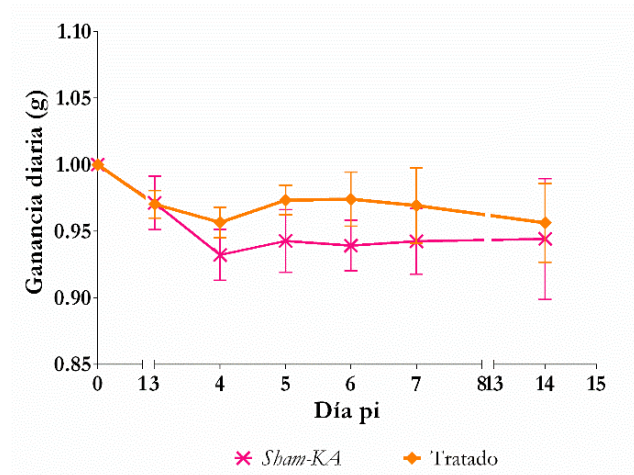


Figura 3.58 Ganancia diaria de peso. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos a lo largo de los días pi, de acuerdo con el test de medidas repetidas. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

3.3.3. Pruebas funcionales

3.3.3.1. Sensibilidad al calor

No se hallaron diferencias significativas en el tiempo de latencia entre los grupos *sham-KA* y tratado (**Fig. 3.59**), aunque el grupo *sham-KA* tuvo mayores valores de latencia que el grupo tratado, en los días 5, 6 y 7 pi.

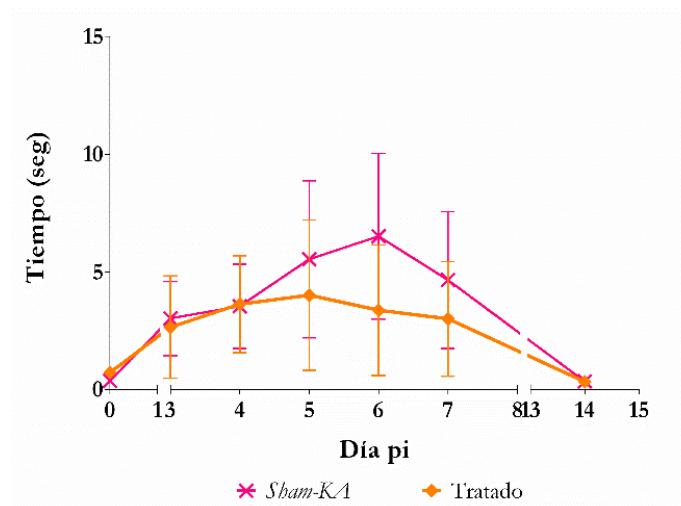


Figura 3.59 Prueba de sensibilidad al calor. Tiempo de latencia (seg) en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas de acuerdo con el test de medidas repetidas. Los datos se expresan como Media \pm SEM. $P > 0,05$.

3.3.3.2. Suspensión en el aire

No se hallaron diferencias significativas entre los tiempos de suspensión en el aire de ambos grupos (**Fig. 3.60**).

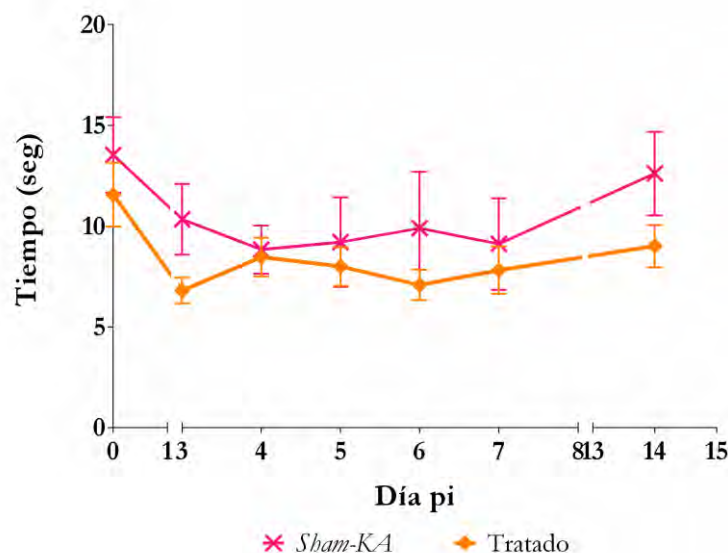


Figura 3.60 Prueba de suspensión en el aire. Tiempo de suspensión (seg) en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas de acuerdo con el test de medidas repetidas. Los datos se expresan como Media \pm SEM. $P > 0,05$.

3.3.3.3. Desplazamiento en escalera horizontal

La cantidad total promedio de pasos para todos los grupos se graficaron en función del día pi (**Fig. 3.61**). La cantidad de pasos de los grupos *sham-KA* y tratado fueron similares en los días 3, 4 y 5 pi. A partir del día 6 pi, el grupo tratado incrementó su cantidad de pasos, acercándose a su valor inicial, mientras que el grupo *sham-KA* no mostró grandes variaciones a partir del día 3 y a lo largo de los restantes días pi, y no logró retornar a su valor inicial.

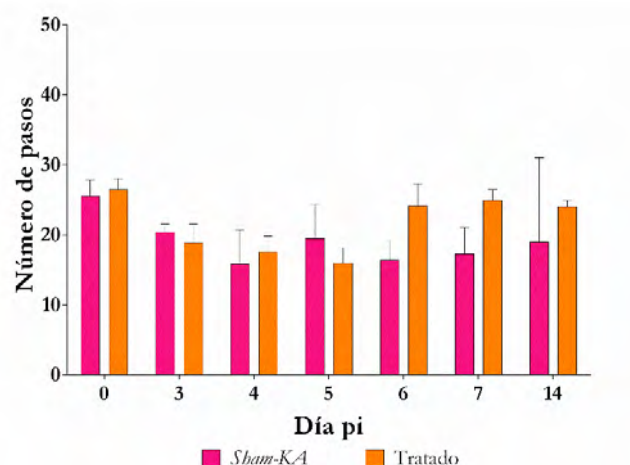


Figura 3.61 Cantidad de pasos por grupo en función del día pi. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

Los pasos totales de cada grupo se desglosaron en las correspondientes categorías y se graficaron para cada día pi (**Fig. 3.62**). En el lado ipsilateral, la mayor proporción de pasos para todos los grupos se registraron en la categoría 6, en todos los días pi. El grupo *sham-KA* registró pasos en la categoría 0 para los días 3, 4, 5 y 6 pi, y en la categoría 2 en los días 3, 4, 5, 6 y 7 pi. Para el grupo tratado se registraron, además, pasos de las categorías 0 y 1 en los días 3 y 4 pi, y de la categoría 2 en los días 3, 4, 5, 6 y 7 pi. Para ambos grupos, los pasos restantes se agruparon dentro de las categorías 3 y 5.

Del lado contralateral, la mayor proporción de pasos correspondió a la categoría 6 para todos los grupos y todos los días pi. Los pasos restantes correspondieron a las categorías 5, 4 y 3. El grupo *sham-KA* también registró un porcentaje apreciable de pasos en la categoría 2 en los días 3, 4, 5, 6 y 7 pi.

Se registró un porcentaje máximo de errores de alrededor de 40% para el grupo *sham-KA*, que a su vez mostró el máximo porcentaje de errores durante todo el experimento (**Fig. 3.63**), en el lado ipsilateral. Del lado contralateral, el porcentaje de errores fue inferior para ambos grupos comparados con el lado ipsilateral. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los días pi.

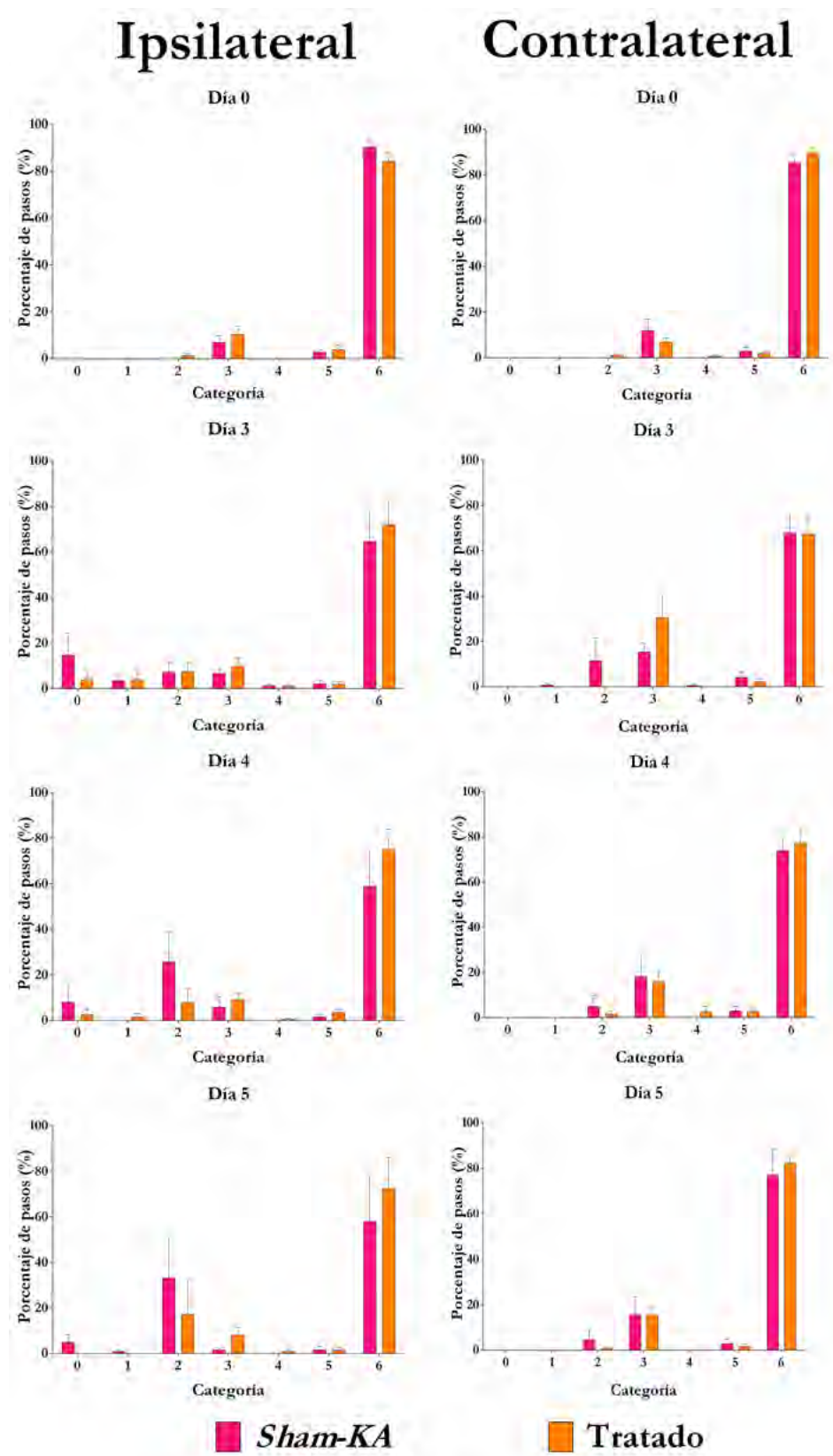


Figura 3.62 Pasos totales distribuidos en las categorías correspondientes. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

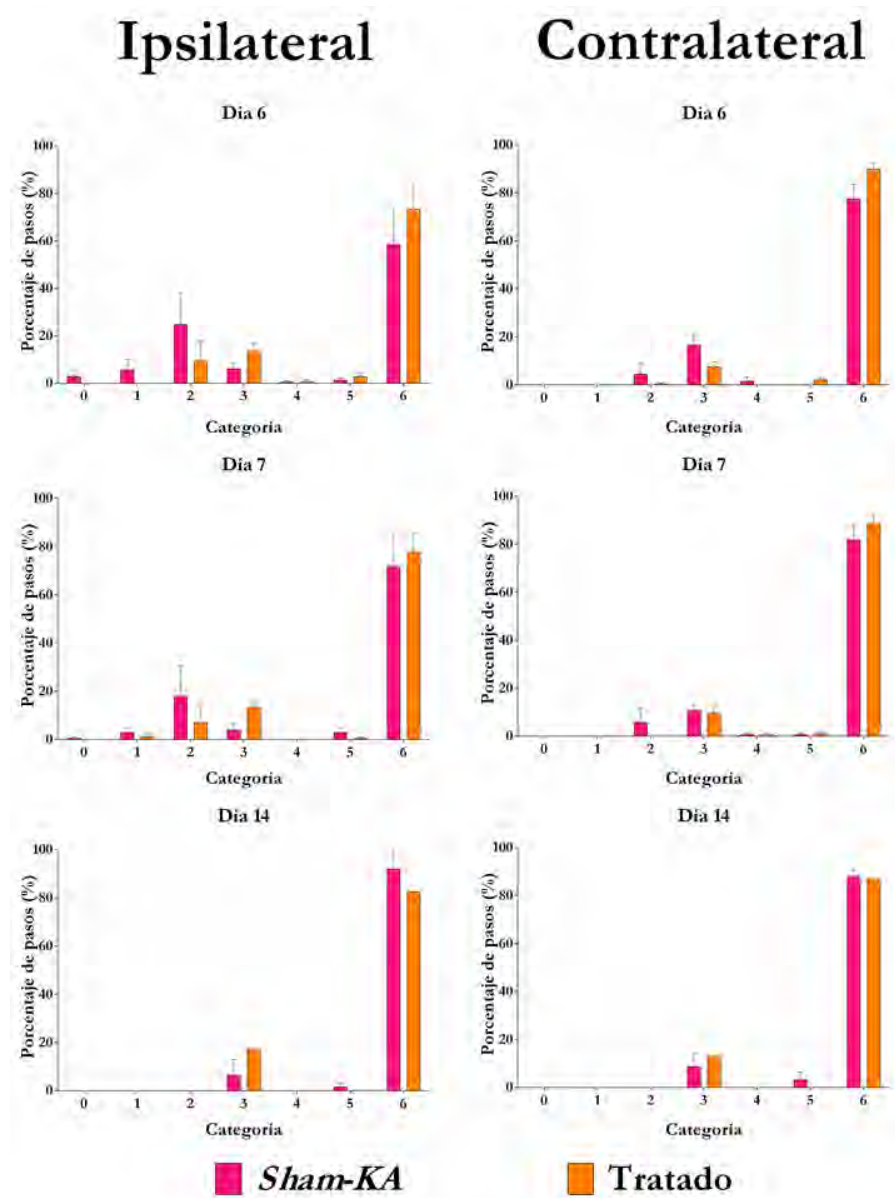


Figura 3.62 (continuación) Pasos totales distribuidos en las categorías correspondientes. Los datos se expresan como Media \pm SEM.

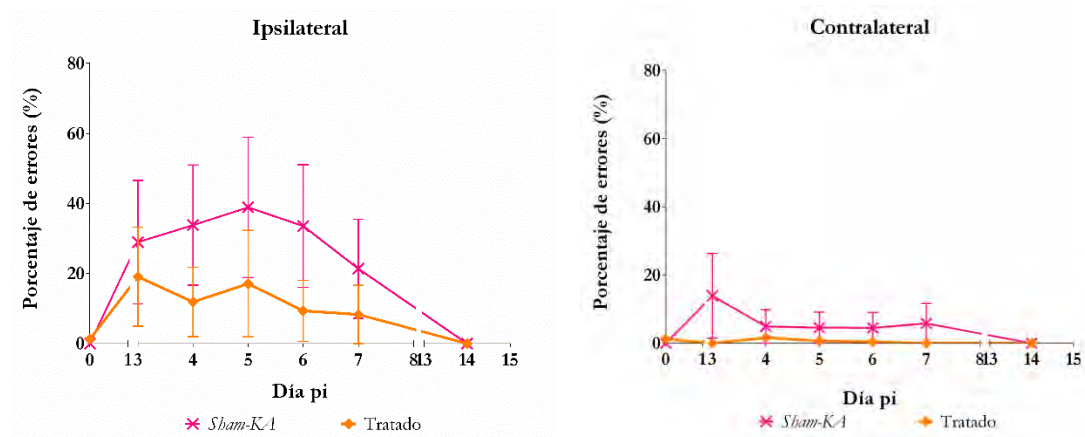


Figura 3.63 -Gráfico de porcentaje de errores en función de días pi para el miembro ipsilateral. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se expresan como Media \pm SEM, $P > 0,5$.

-Gráfico de porcentaje de errores en función de días pi para el miembro ipsilateral. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se expresan como Media \pm SEM, $P > 0,5$.

3.3.4. Histoquímica

La tinción con violeta de cresilo de las secciones cervicales correspondientes tanto al grupo *sham-KA* como tratado no mostraron alteraciones del tejido.

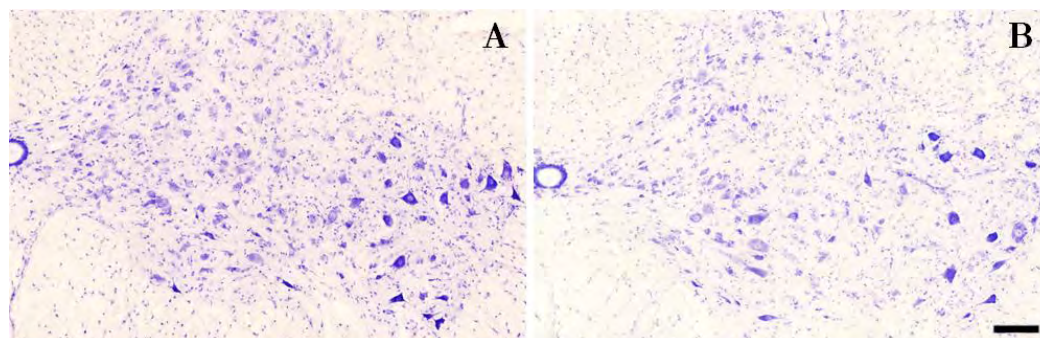


Figura 3.64. Aspecto histológico de secciones del segmento C5 pertenecientes a los grupos *sham-KA* (A) y tratado (B) que muestran la distribución y el aspecto de las neuronas para el día 7 pi. Se aprecia un aumento en la reactividad glial para el grupo *sham-KA* del lado ipsilateral. Barra = 100 μ m.

3.3.4.1. Identificación de mielina

Las secciones correspondientes a los grupos *sham-KA* y tratado mostraron tinción de las fibras dorsales y ventrales en tono azul verdoso, y las neuronas se

tiñeron en violeta (**Fig. 3.65**). La tinción de ambas sustancias fue homogénea. No se apreciaron diferencias aparentes entre los grupos.

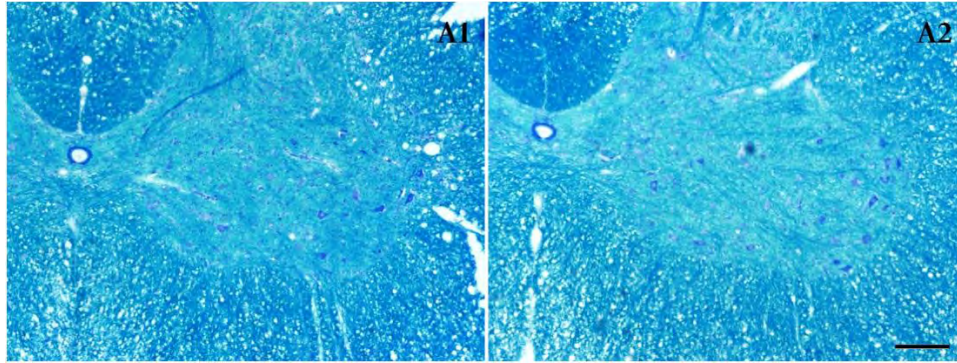


Figura 3.65 Identificación de mielina usando doble tinción con *Luxol Fast Blue* y violeta de cresilo. Se muestran las regiones ventrales ipsilaterales de los grupos tratado (**A1**) y *sham-KA* (**A2**). Para ambos grupos las imágenes corresponden a 7 días pi. Barra: 200 μm .

3.3.5. Inmunohistoquímica

3.3.5.1. Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN

La técnica de IHQ permitió evidenciar la presencia de neuronas en toda la sustancia gris, en ambos grupos (**Fig. 3.66**). Fue posible observar la marca tanto en los núcleos, bien definidos, como también en los somas.

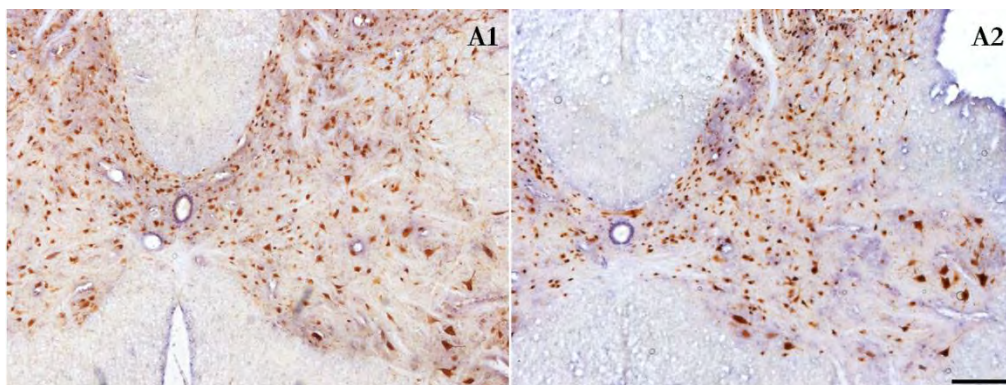


Figura 3.66 Identificación de neuronas mediante el anticuerpo anti-NeuN. Se muestran regiones ipsilaterales correspondientes a los grupos tratado (**A1**) y *sham-KA* (**A2**). En ambos casos las imágenes corresponden al día 14 pi. Barra: 200 μm .

3.3.5.2. Identificación y determinación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP

La tinción con el anticuerpo anti-GFAP permitió observar la presencia de astrocitos distribuidos por toda la sección medular, con mayor abundancia en la sustancia gris con respecto a la sustancia blanca, para ambos lados de las secciones del segmento C5 de la médula espinal (**Fig. 3.67**). Asimismo, la marca se observó más abundante y definida en las secciones correspondientes al grupo tratado.

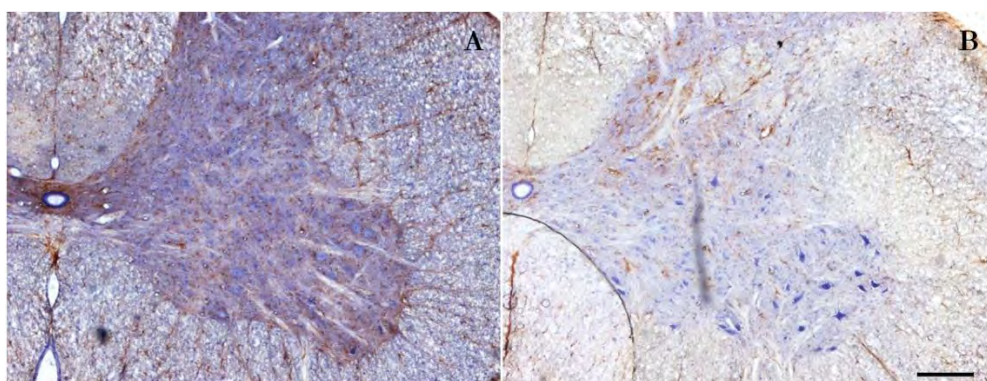


Figura 3.67 Identificación de astrocitos mediante el anticuerpo anti-GFAP. Se muestran regiones ipsilaterales correspondientes a los grupos tratado (A) y *sham-KA* (B). En ambos casos las imágenes corresponden al día 14 pi. Barra: 200 μm .

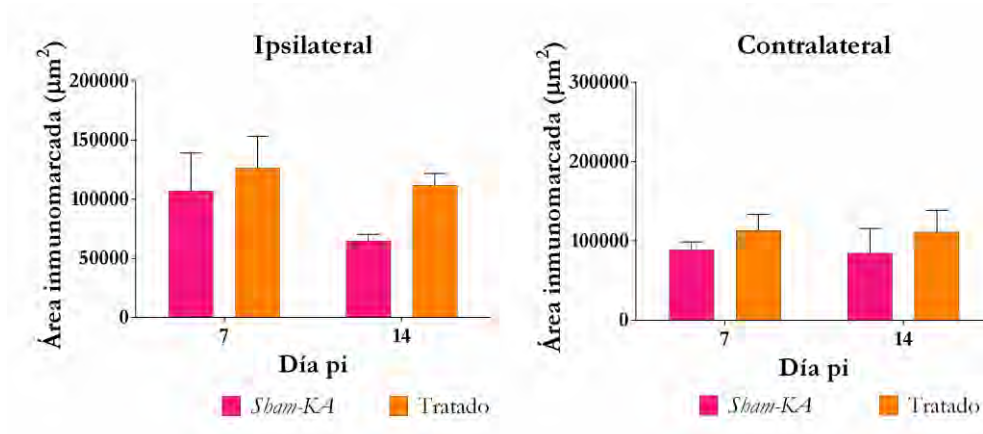


Figura 3.68 Área inmunomarcada con GFAP para los grupos *sham-KA* y tratado en función del tiempo, para las hemimédulas ipsilateral y contralateral. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se expresan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Si bien el área inmunomarcada con GFAP del grupo *sham-KA* fue menor a la del grupo tratado, en los días 7 y 14 pi y en ambas hemimédulas, estas diferencias no fueron significativas (**Fig. 3.68**).

3.3.5.3. Identificación y determinación de neurofilamentos mediante el anticuerpo anti-NF

La tinción con el anticuerpo anti-NF mostró características similares a las descritas en las etapas previas (sección 3.1.3.3) (**Fig. 3.69**).

En la hemimédula ipsilateral, el grupo tratado mostró mayor porcentaje de marca en la sustancia gris al día 7 pi con respecto al grupo *sham-KA*, mientras que la marca en la sustancia blanca fue ligeramente menor a la de este último grupo. Al día 14 pi ambos grupos redujeron su marca en la sustancia gris y el grupo *sham-KA*, además, redujo su marca en la sustancia blanca (**Fig. 3.70**). El mismo comportamiento se observó para ambos grupos en la hemimédula contralateral.

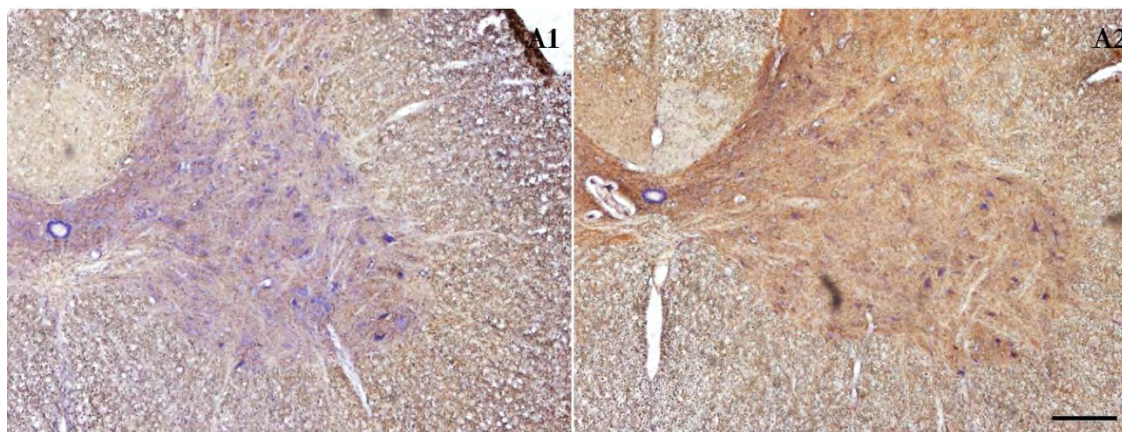


Figura 3.69 Identificación de neurofilamentos (NF). **A1-** Región ipsilateral perteneciente al grupo tratado para el día 7 pi. **A2-** Región ipsilateral perteneciente al grupo *sham-KA* para el día 7 pi. Barra: 200 μ m.

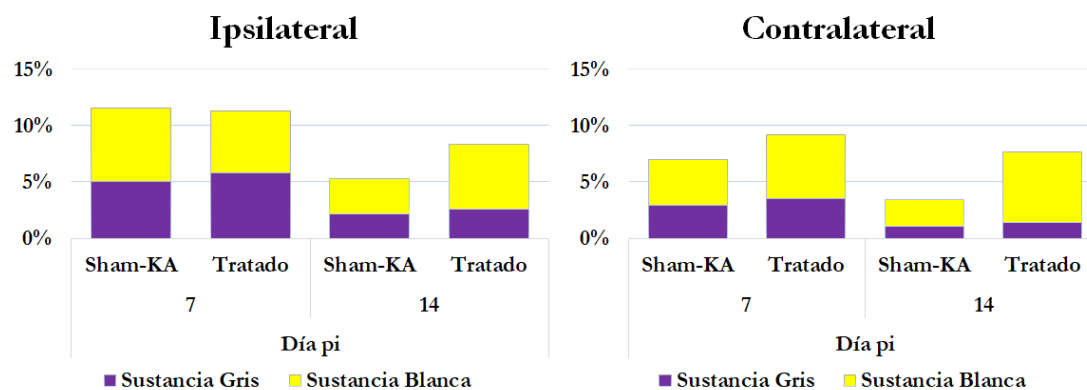


Figura 3.70 Distribución porcentual de la marca de NF en secciones del segmento C5 para los grupos *sham-KA* y tratado. El área positiva para NF en las sustancias gris y blanca, se expresa como porcentaje del área total en cada hemimédula.

3.3.6. Análisis morfométrico

La comparación de las áreas de sección transversal del segmento C5 no mostró diferencias significativas entre los grupos para ambas hemimédulas y en ambos días pi (**Fig. 3.71**).

El número de neuronas de las secciones del segmento C5 para el grupo *sham-KA* fue menor con respecto al del grupo tratado, en todos los días pi y en ambas hemimédulas, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Fig. 3.72**).

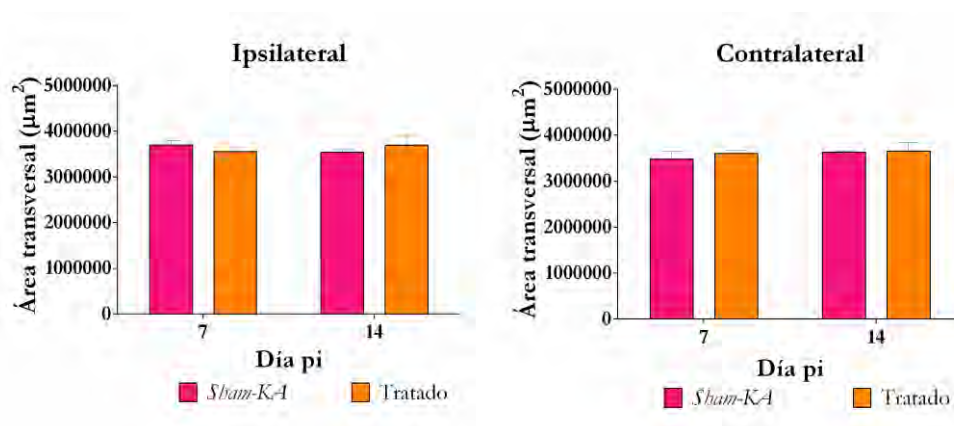


Figura 3.71 Área de la sección transversal de las hemimédulas en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se expresan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

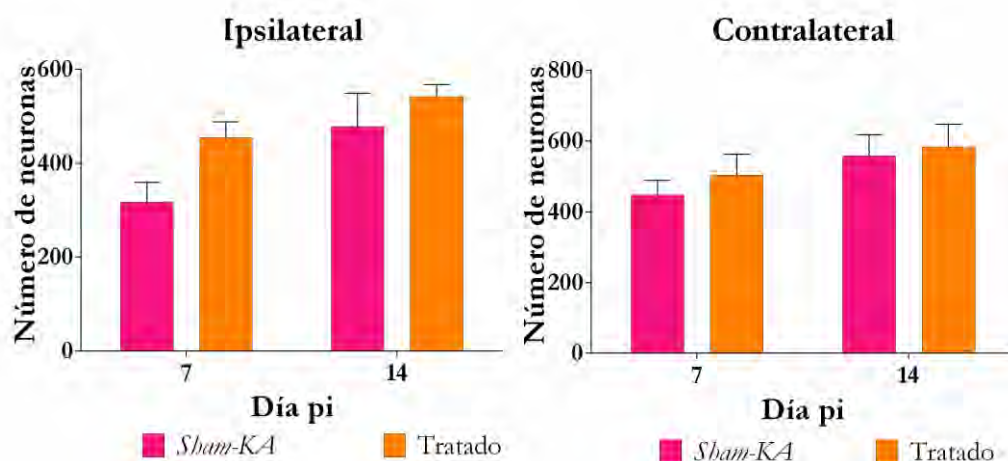


Figura 3.72 Recuento neuronal en el segmento C5. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se expresan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Se realizó, también, la estimación del número total de neuronas para todo el segmento C5 (**Tabla 3.3**). No se hallaron diferencias significativas entre los grupos, tanto para el lado ipsilateral como para el contralateral.

Día pi ^a	<i>Sham-KA</i>	Tratado
7	214875 \pm 13252	239467 \pm 14115
14	222400 \pm 15007	241500 \pm 11768
Día pi ^b	<i>Sham-KA</i>	Tratado
7	224789 \pm 11305	223983 \pm 11799
14	236125 \pm 16389	237967 \pm 12574

Tabla 3.3 Recuento estimado por segmento, para la hemimédula ipsilateral^a, y contralateral^b. Los datos se presentan como Media \pm SEM. * $P < 0,05$.

Para el análisis de los parámetros morfométricos, se dividió a la sustancia gris de cada hemimédula en tres regiones: dorsal, central y ventral, al igual que fuera realizaron en las etapas anteriores. A continuación, se detallan las variaciones de los parámetros morfométricos para las poblaciones neuronales de la región ventral.

3.3.6.1. Región ventral

La comparación de las áreas neuronales no mostró diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi en ambas hemimédulas (**Fig. 3.73**).

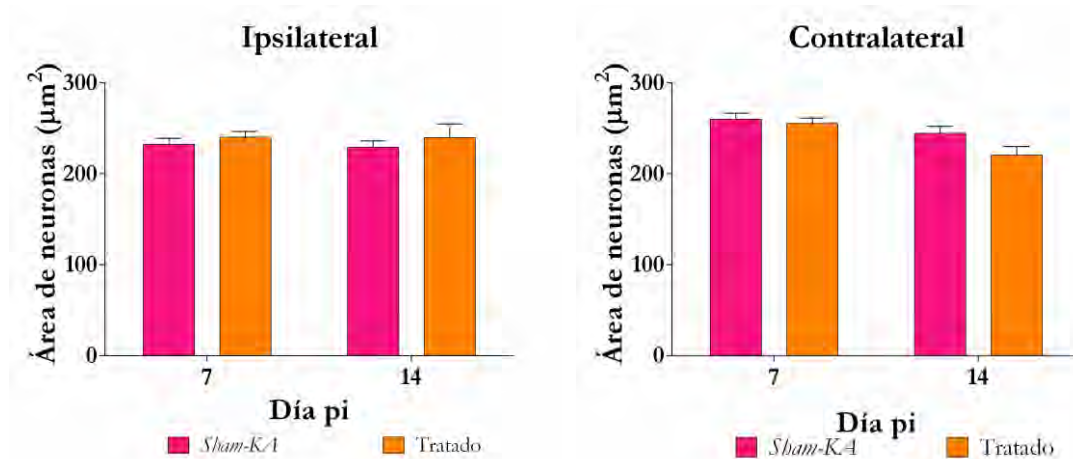


Figura 3.73 **Izquierda:** Área de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$. **Derecha:** Área de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

El diagrama de cajas y bigotes para los valores de área neuronal de la región ventral mostró que (**Fig. 3.74**) en la hemimédula ipsilateral, al día 7 pi los grupos *sham-KA* y tratado exhibían valores mínimos y máximos similares entre sí; mientras que, tanto la amplitud de las cajas como las medianas eran similares para ambos grupos. Al día 14 pi, los grupos mostraron cajas con tamaños similares, al igual que sucede con los tamaños mínimos y máximos, sugiriendo que las neuronas de ambos grupos presentaban similares características.

En el lado contralateral, los grupos *sham-KA* y tratado mostraron valores similares en la amplitud de sus cajas en el día 7 pi. Para el día 14 pi, la caja correspondiente al grupo *sham-KA* se hallaba ligeramente desplazada hacia arriba con respecto a la del día 7 pi y con una mediana superior. En cuanto al grupo tratado, el valor máximo y la mediana se redujeron.

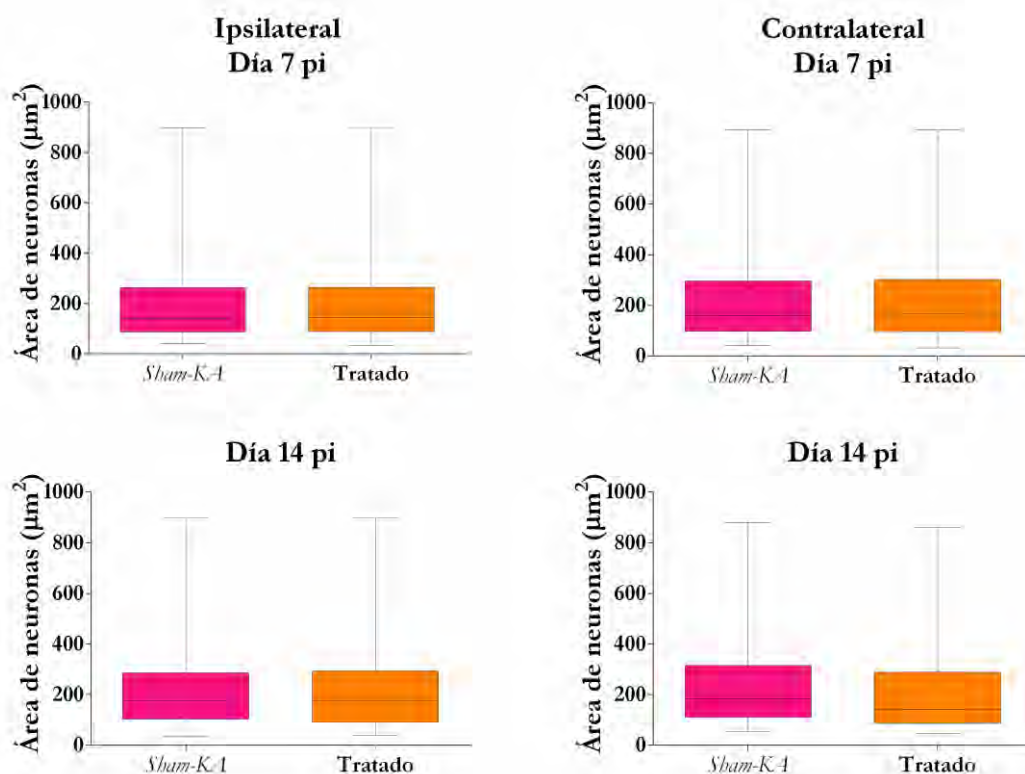


Figura 3.74 Representación mediante gráfico de cajas y bigotes del parámetro morfométrico área neuronal para la región ventral, por día pi y para ambas hemimédulas. El gráfico muestra la distribución de los tamaños neuronales mediante la representación gráfica de los cuartiles, la mediana y los valores mínimo y máximo para los grupos, por día pi y para ambas hemimédulas.

La comparación de los diámetros de las neuronas de la región ventral mostró diferencias significativas entre los grupos para el día 14 pi en el lado contralateral (**Fig. 3.75**). Los grupos *sham-KA* y tratado mantuvieron sus valores, aproximadamente constantes, en los días 7 y 14 pi del lado ipsilateral; el grupo *sham-KA* a su vez, mostró ese mismo comportamiento en la hemimédula contralateral, mientras que el grupo tratado redujo significativamente su valor promedio en el día 14 pi, comparado con el grupo *sham-KA*.

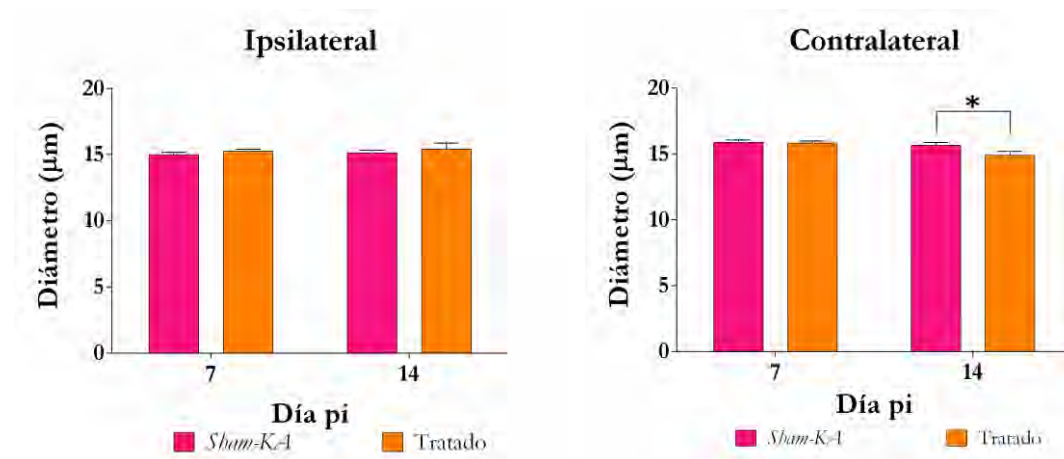


Figura 3.75 Izquierda. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **sham-KA* vs. tratado. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

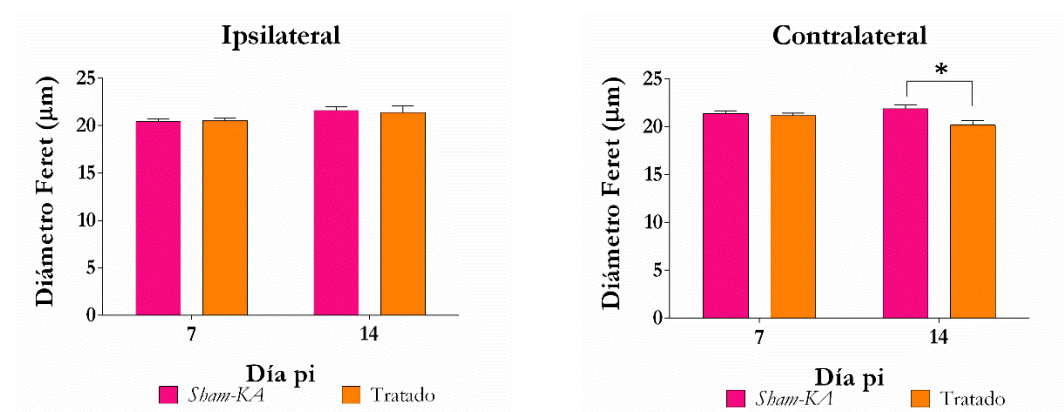


Figura 3.76 Izquierda: Diámetro feret de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha: Diámetro feret de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **sham-KA* vs. tratado. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

El diámetro feret mostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos para el día 14 pi en el lado contralateral (**Fig. 3.76**), donde el valor del grupo *sham-KA* fue significativamente mayor al del grupo tratado.

El análisis de los perímetros mostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos para el día 14 pi y en la hemimédula contralateral (**Fig. 3.77**), donde el perímetro del grupo *sham-KA* fue significativamente mayor al del grupo tratado.

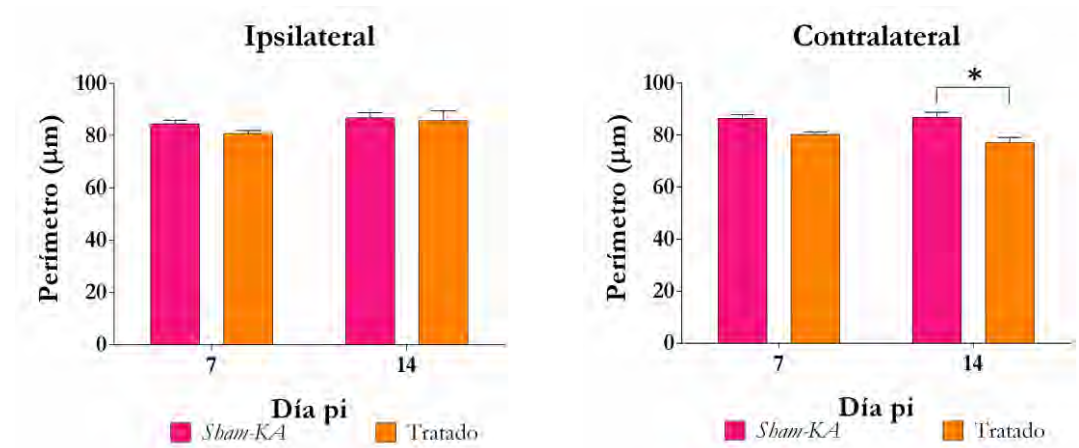


Figura 3.77 Izquierda: Perímetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha: Perímetro de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **sham-KA* vs. tratado. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

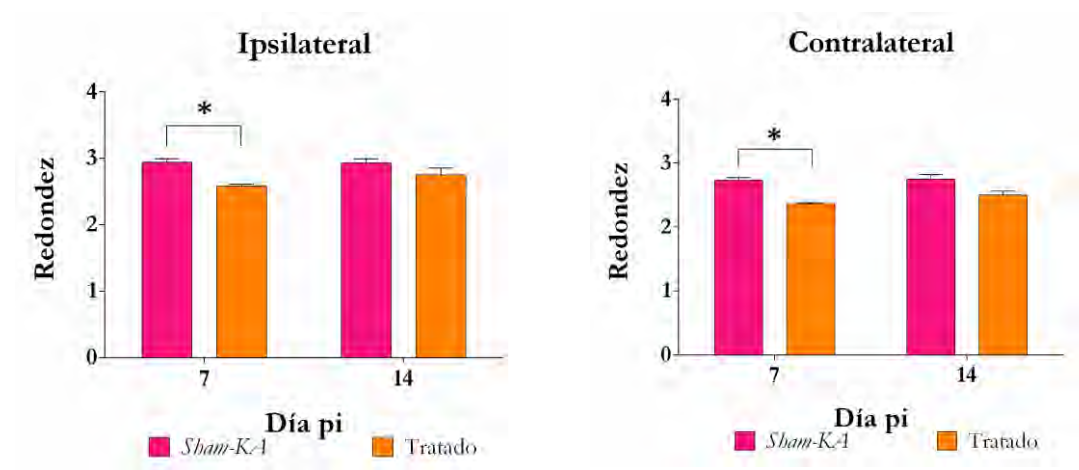


Figura 3.78 Izquierda: Redondez de las neuronas de la región ventral de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **sham-KA* vs. tratado. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

Derecha: Redondez de las neuronas de la región ventral de la hemimédula contralateral en función del día pi. **sham-KA* vs. tratado. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

La comparación del parámetro redondez demostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos para el día 7 pi, en ambas hemimédulas (**Fig. 3.78**). En ambos casos, los valores del grupo *sham-KA* fueron significativamente mayores a los del grupo tratado.

3.3.6.2. Regiones dorsal y central

En la región dorsal no hubo diferencias significativas entre los valores de áreas, diámetro y diámetro feret de las neuronas de los grupos *sham-KA* y tratado, para ambas hemimédulas. Los valores para el parámetro perímetro, fueron significativamente diferentes entre los grupos para el día 7 pi en ambas hemimédulas. En cuanto a la redondez, los grupos fueron significativamente diferentes en los días 7 y 14 pi del lado ipsilateral, y al día 7 pi del lado contralateral.

En la región central, no se registraron diferencias significativas entre los valores de diámetro, perímetro y diámetro feret de las neuronas de los grupos *sham-KA* y tratado, para ambas hemimédulas. Las áreas neuronales de los grupos fueron significativamente diferentes en el día 14 pi del lado ipsilateral; mientras que para la redondez se hallaron diferencias significativas entre los grupos para los días 7 y 14 pi en el lado ipsilateral, y para el día 7 pi en el lado contralateral. Los gráficos para los diferentes parámetros por hemimédula y región, junto con los correspondientes datos estadísticos se presentan en el Anexo 1.

3.3.7 DISCUSIÓN

En esta segunda etapa se evaluaron los efectos clínicos y de comportamiento, así como también los efectos tisulares y celulares producidos por la inyección intraparenquimatosa simultánea de 0,5 % lidocaína y 1 mM KA, con el objetivo de determinar si la lidocaína atenúa en alguna forma los efectos nocivos del KA. Asimismo, se puso a prueba la capacidad de la lidocaína como agente terapéutico frente de las acciones lesivas del KA sobre el tejido nervioso.

En nuestro estudio, los animales inyectados solo con KA mostraron un deterioro significativo de sus funciones sensitivas y motoras durante los primeros dos días posteriores a la inyección. Estos resultados fueron coincidentes con lo previamente establecido para nuestro modelo ([Nishida *et al.*, 2015](#)). Si bien los animales de los grupos KA1 y KA1L05 no perdieron peso a lo largo del período analizado, solo experimentaron un aumento de su peso corporal a partir del día 3. La ausencia de variación en el peso durante los primeros dos días probablemente se deba al estrés causado por la manipulación quirúrgica de los animales ([Brennan *et al.*, 2009](#)). No obstante, el aumento de peso en los días posteriores fue significativamente mayor para los animales inyectados con lidocaína y KA, en comparación con los que recibieron solo KA. La ganancia en el peso corporal luego de una injuria ya fue observada con anterioridad por [Lei *et al.* \(2001\)](#) en animales tratados con lidocaína antes y durante la exposición a una isquemia cerebral, en contraposición a los animales no expuestos al AL. Sin embargo, en nuestros estudios dicha mejora no se observó en los animales que fueron tratados con lidocaína 3 días después de la inyección de KA.

Utilizando el protocolo de inyección simultánea de lidocaína y KA, los animales mostraron un mejor desempeño en las pruebas de comportamiento con respecto a los animales inyectados con 1 mM KA. Así, los animales del grupo

KA1L05 obtuvieron tiempos de latencia significativamente menores a los del grupo KA1 en la prueba de sensibilidad al calor. En este último grupo el tiempo de latencia se incrementó al día 1 pi, lo cual podría deberse a que las neuronas de la región dorsal son las más sensibles al kainato (Mazzone *et al.*, 2010).

El tiempo de suspensión fue mayor para el grupo KA1L05 en comparación con el grupo KA1 en todos los días pi, mientras que el número de errores para el desplazamiento en la escalera horizontal fue significativamente mayor para el grupo KA1. En la médula espinal de la rata, la distribución de las subunidades del receptor de kainato se ubica principalmente en las láminas más superficiales del asta dorsal y a nivel de las motoneuronas. Dado que las subunidades del receptor AMPA y NMDA también se expresan en abundancia en las astas dorsal y ventral, es probable que, incluso concentraciones bajas (10 μ M) de KA, provoquen efectos que contribuyan en gran medida con la liberación de glutamato endógeno, que actúa en múltiples subclases de receptores y en neuronas no glutamatérgicas (Mazzone *et al.*, 2010). Una elevada concentración extracelular de glutamato en la médula espinal evoca daño excitotóxico con pérdida neuronal y deterioro de las funciones locomotoras (Mazzone *et al.*, 2017).

En nuestras observaciones, KA principalmente afectó a la región media (Lámina VI, donde se llevó a cabo la descarga de la inyección) y la región ventral (asta ventral del segmento C5 de la médula espinal). En apariencia, las motoneuronas tendrían una sensibilidad especial a la excitotoxicidad (Mazzone *et al.*, 2010). De hecho, las motoneuronas también son muy sensibles a la lesión con KA en los cultivos de corte organotípico, y en cultivos primarios de neuronas motoras. Sin embargo, aun son necesarios estudios que permitan comprender el mecanismo de muerte de las motoneuronas provocado por el kainato y si existen subtipos de motoneuronas más resistentes que otros, dado

que no se detecta la desaparición completa de dichas células (Mazzone *et al.*, 2010).

Sin embargo, utilizando la inyección intraparenquimatosa simultánea de lidocaína y KA, ninguno de estos efectos se observó durante todo el experimento, a la vez que el recuento neuronal fue estadísticamente más alto para este grupo en comparación con los animales del grupo KA1, tanto en secciones individuales del segmento C5, como en todo el segmento. Por otra parte, los cambios morfométricos observados en las neuronas del grupo KA1 no se detectaron en el grupo KA1L05, que mostró una relativa uniformidad del tamaño y la distribución de su población neuronal a lo largo de todo el experimento. Por lo tanto, estos hallazgos podrían sugerir una acción neuroprotectora de la lidocaína.

Si bien no se dispone de informes en los que se hayan analizado los efectos simultáneos de la lidocaína y el KA sobre la médula espinal, se dispone de información exhaustiva acerca de los efectos de los bloqueadores de canales de Na^+ en general y de la lidocaína en particular, frente al incremento de la liberación de glutamato en el tejido nervioso. La mayoría de estos estudios fueron llevados a cabo *in vitro*, en condiciones de hipoxia; si bien el tipo de injuria desencadenante difiere de la utilizada en nuestros estudios, los mecanismos de neuroprotección propuestos con base en estos modelos bien podrían explicar lo observado en el presente trabajo.

La neuroprotección *in vitro* se consigue si la muerte celular causada por la privación de oxígeno y glucosa, o por la activación de receptores de glutamato es prevenida por el tratamiento aplicado. Se sabe que la liberación y acumulación de glutamato inicia cascadas de eventos bioquímicos que culminan en muerte celular. El daño neuronal resulta de la pérdida de la homeostasis del Ca^{+2} que desencadena una serie de eventos bioquímicos, que incluyen la activación de enzimas degradativas y la formación de radicales libres. La

elevación excesiva del Ca^{+2} extracelular ocurre en forma secundaria a la acumulación de concentraciones excitotóxicas de glutamato en el espacio extracelular (Probert *et al.*, 1997). Se sabe que la liberación de glutamato producida por la despolarización tiene dos componentes, uno dependiente de Ca^{+2} , que se produce por la exocitosis de vesículas sinápticas, y otro independiente de Ca^{+2} , que se atribuye al flujo reverso de glutamato por el transportador de glutamato debido a despolarización prolongada (Lin *et al.*, 2013).

Estudios *in vitro*, utilizando cortes de hipocampo de rata, demostraron que la liberación masiva de glutamato es sensible a bloqueadores de los canales de Na^{+} , como la lidocaína (Taylor *et al.*, 1995). Este AL, en concentraciones mayores a 0,1 mM (0,002 %), deprime la función sináptica normal e incrementa la tasa de recuperación de este tejido cerebral a partir de los 15 min posteriores a un insulto hipóxico. Aparentemente, la protección contra el daño derivaría de la efectividad de la lidocaína para bloquear la entrada sostenida de Na^{+} (y posiblemente la entrada concomitante de Ca^{+2}) después de la despolarización hipóxica (Lucas *et al.*, 1989). Otros estudios indican que los moduladores de los canales de sodio dependientes de voltaje, como la lidocaína, podrían reducir o retrasar la liberación de glutamato no sináptica causada por el agotamiento de ATP y la reversión de la captación de glutamato; el canal de sodio tendería a prevenir la despolarización celular y preservaría el gradiente transmembrana normal de iones de sodio (Taylor *et al.*, 1995).

De acuerdo con lo descrito previamente, diversos mecanismos pueden contribuir con la reducción de la injuria luego del tratamiento con un bloqueador de los canales de Na^{+} , como la lidocaína. Un ingreso reducido de Na^{+} puede disminuir o retrasar la despolarización neuronal, lo cual puede acarrear varios efectos beneficiosos como, por ejemplo, la reducción de la liberación de neurotransmisores excitatorios presinápticos y la subsecuente

activación de los receptores NMDA, así como la reducción de la entrada de Ca^{+2} a través de los canales operados por voltaje. La inhibición de la entrada/carga de Na^{+} puede tener efectos benéficos adicionales, que incluyen la reducción de la demanda de ATP para mantener el equilibrio del Na^{+} , así como la reducción de la captación de agua, cloruro y la consecuente tumefacción. De esta manera, se reduce la liberación de glutamato, causada por la inversión del transportador de glutamato, así como también se reduce la liberación de Ca^{+2} desde los almacenamientos mitocondriales intracelulares, por reversión del intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$. Como los moduladores del canal de Na^{+} tienen efecto leve o nulo sobre el ingreso de Ca^{+2} inducido por glutamato, se sugiere que la neuroprotección estaría mediada por la inhibición de la liberación de glutamato más que por efectos pos-sinápticos (Probert *et al.*, 1997). Lin *et al.* (2013) demostraron que los AL inhiben la liberación de glutamato desde las terminales nerviosas cerebrocorticales por reducción de la entrada de Ca^{+} a través de los canales $\text{Ca}_v2.2$ y $\text{Ca}_v2.1$, en ausencia de cualquier efecto en la excitabilidad de las terminales nerviosas. Esta inhibición parecería depender, al menos parcialmente, de la supresión de las actividades de las PKC y PKA.

Como se discutió en la primera parte, los animales que recibieron 0,5 % lidocaína por vía intraparenquimatosa no mostraron lesiones tisulares. De la misma manera, los animales del grupo KA1L05 solo mostraron una lesión tisular limitada al área correspondiente a la introducción de la aguja. Esto indicaría que, de acuerdo con la concentración seleccionada, la lidocaína sola o en combinación con KA sería inocua para el tejido nervioso. Diversos autores observaron que la lidocaína inyectada por diversas vías tampoco produce daño en el tejido nervioso. Por el contrario, cuando la lidocaína se administra por vía intravenosa 30 minutos antes, durante y después de una isquemia cerebral, se reduce el alcance, la gravedad y la intensidad de las lesiones sobre las

poblaciones neuronales del hipocampo, así como se reduce el tamaño del área cerebral infartada y se mejora la recuperación neurológica y cognitiva (Lei *et al.*, 2001; Popp *et al.*, 2011). La administración subcutánea de lidocaína 30 min antes de una isquemia y 3, 24 and 48 h después de su inducción, redujo el número de células isquémicas en la región CA1 del hipocampo (Goyagi *et al.*, 2009). Además, una inyección de lidocaína (0,8 o 4 mg/kg, i.p.) aplicada 30 min antes de una inyección de KA (15 mg/kg, i.p.) redujo significativamente la muerte neuronal en la región CA3 del hipocampo, lo cual se manifestó mediante una significativa reducción del número de células positivas a Fluoro Jade B (Chiu *et al.*, 2016). Este efecto atenuante de la reducción del número de neuronas también fue observado en nuestro trabajo con la aplicación simultánea de lidocaína y KA. Sin embargo, al administrar lidocaína en forma posterior a la inyección de KA no fue posible observar cambios respecto al grupo no tratado. La injuria del SNC, particularmente aquella generada por excitotoxicidad, produce la pérdida de axones y con ello la liberación de grandes cantidades de NF y sus subunidades. En trabajos previos, nuestro grupo describió la presencia de NF en el pericarion y dendritas de neuronas correspondientes a animales inyectados con 1 mM KA en los días 3 pi del lado contralateral y al día 7 pi de ambos lados (Nishida *et al.*, 2017). Al igual que en aquel estudio, en el presente trabajo, se observó una reducción de la expresión de NF en la sustancia blanca, probablemente debida a la pérdida de neuronas ocasionadas por la injuria y la concomitante pérdida de axones, dado que aunque los filamentos intermedios se hallan presentes en el pericarion y dendritas, son particularmente abundantes en los grandes axones mielinizados, donde son esenciales para el crecimiento radial durante el desarrollo y el mantenimiento del calibre del axón (Nishida *et al.*, 2017). Sin embargo, observamos un incremento de área inmunomarcada con NF para las secciones del grupo KA1L05 respecto a las del grupo KA1, con preponderancia en la sustancia blanca, lo cual no resulta extraño

considerando que el número de neuronas no se redujo en este grupo con respecto al grupo KA1. Se observó incluso, expresión de NF en somas neuronales de la zona ventral ipsilateral al día 14 pi. Anteriormente, Mitra *et al* (2013) realizaron el análisis cualitativo de la marcación con NF en secciones de la médula espinal luego de una inyección intracisternal de bajas dosis de KA, y observaron un incremento de la expresión de este filamento intermedio como estructuras de color pardo alrededor de las neuronas motoras en la sustancia gris ventral. Dicha expresión de NF se observó hasta por 2 semanas después de la inyección de KA, en las regiones cervical y lumbar de la médula espinal de rata (Mitra *et al.*, 2013). Podría sugerirse, entonces, que la lidocaína reduciría la acción deletérea ejercida por el KA, con la consecuente destrucción axonal.

La muerte neuronal inducida por KA se acompaña de un incremento en la activación de los astrocitos. La astrogliosis inducida por excitotoxicidad se ha considerado como un marcador de neurotoxicidad (Zhang & Zhu, 2011). Los astrocitos reactivos están hipertrofiados, el número de filamentos intermedios aumenta y, por lo tanto, son más inmunorreactivos a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Dusart *et al.*, 1991). En nuestro estudio, el KA provocó un incremento de la inmunoreactividad al GFAP, lo cual permite presumir un aumento de la reactividad de los astrocitos, con un pico en el día 3 pi. El comportamiento de la población astrogliar en presencia de KA ya había sido descrito por Sabilallah *et al.* (2016), quien demostró que el KA induce astrogliosis que alcanza su pico máximo en el día 3 pi y disminuye progresivamente hacia el día 15 pi, y es posible observarla, incluso, hasta un mes después de la aplicación del KA (Zhang & Zhu, 2011). Los astrocitos pueden detectar la presencia de factores de lesión o estrés en el microambiente y activarse en su respuesta (Ben Haim *et al.*, 2015). De este modo, la activación de los astrocitos en las secciones correspondientes al grupo KA1 podría ser una consecuencia de la muerte neuronal masiva, la que induciría la liberación de

numerosas sustancias, incluyendo glutamato y potasio, que llevarían a hipertrofia de los astrocitos (Dusart *et al.*, 1991). Las células GFAP positivas se detectaron en las secciones del grupo KA1 hasta la segunda semana pi, lo cual podría ser consecuencia de la migración interna de astrocitos reactivos desde la periferia de la lesión y, de la detección de pequeños astrocitos reactivos ya presentes en la lesión (Dusart *et al.*, 1991).

La reactividad astrogial observada en la hemimédula contralateral podría estar relacionada, y justificarse, por la liberación de factores cerebrales o sanguíneos como resultado de la lesión y por la migración de astrocitos, previamente activados (Jegliński *et al.*, 1995), así como por la activación generalizada de redes de astrocitos unidos por uniones gap (Dusart *et al.*, 1991), tal como fuera descrito para los animales *sham*.

Los astrocitos activados producen citoquinas pro y antiinflamatorias, quimocinas, factores neurotróficos y otros moduladores que participan en la comunicación neurona-glía (Zhang & Zhu, 2011). La lidocaína demostró poseer propiedades antiinflamatorias al inhibir, de manera concentración dependiente, la expresión génica de citoquinas tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la microglía, a concentraciones tales como 10 mM, que no comprometen la viabilidad de las células (Su *et al.*, 2010). El KA induce significativamente la expresión génica de esas citoquinas proinflamatorias, pero la aplicación previa de lidocaína la reduce de manera significativa (Chiu *et al.*, 2016). En el presente trabajo no se estudió la expresión de estos factores proinflamatorios; sin embargo, considerando que la neuroinflamación contribuye de modo significativo con el daño tardío después de una lesión aguda y con los efectos perjudiciales de la recuperación neurológica (Penkowa *et al.*, 2005), podría hipotetizarse que los efectos antiinflamatorios de la lidocaína podrían contribuir con la reducción de la muerte neuronal y con el mejoramiento del desempeño

en las pruebas de comportamiento de los animales que recibieron 0,5 % lidocaína en forma simultánea a la inyección de 1 mM KA.

Cuando se inyectó simultáneamente 1 % lidocaína y 1 mM KA, ninguno de los animales sobrevivió a la cirugía. Como se indicó previamente, al día de hoy, no se encuentran datos bibliográficos que documenten los efectos de la inyección conjunta de lidocaína y KA, por lo cual no es posible argumentar frente a otros resultados. Teniendo en cuenta los efectos citotóxicos discutidos en la primera etapa del presente trabajo y la dependencia de éstos con la concentración aplicada del AL, sería posible pensar que, si bien la aplicación intraparenquimatosa individual de 1,0 % lidocaína no causó daños severos, la inyección simultánea con un agente excitotóxico haya resultado en una potenciación de los efectos intrínsecos de ambos activos y en la potenciación de la toxicidad debida a la acción conjunta.

Dados los efectos beneficiosos de la inyección simultánea de 0,5 % lidocaína y 1 mM KA frente a la toxicidad inducida por el KA, y los antecedentes disponibles en bibliografía ([Chiu *et al.*, 2016](#); [Goyagi *et al.*, 2009](#); [Lei *et al.*, 2001](#) y [Popp *et al.*, 2011](#)) decidimos evaluar los efectos positivos de la aplicación de una inyección de 0,5 % lidocaína en la cisterna magna, 72 h posteriores a la inyección intraparenquimatosa de 1 mM KA. Sin embargo, no fue posible observar cambios significativos entre los animales tratados y los animales no tratados (*sham-KA*), tanto en las pruebas de comportamiento como en el recuento neuronal y la expresión de los marcadores específicos. La vía intracisternal utilizada para la inyección de la lidocaína en este estudio ha demostrado que permite la llegada de soluciones hasta la médula espinal y otros centros nerviosos ([Bradbury & Lathem, 1965](#); [Chelly *et al.*, 1979](#); [Mitra *et al.*, 2013](#)). De acuerdo con su estructura anatómica, la cisterna magna distribuye el LCR a las meninges del cerebro y de la médula de manera simultánea ([Hirst *et al.*, 2003](#)). Este detalle anatómico permite especular que parte de la lidocaína

inyectada, luego de diluirse en el LCR, haya llegado parcialmente a la médula espinal injuriada, reduciéndose, de este modo, la cantidad de principio activo disponible para ejercer acción. Asimismo, en este caso administramos una inyección única y aislada de lidocaína, a diferencia de las infusiones continuas o repetidas utilizadas en otros protocolos (Chiu *et al.*, 2016; Gallos *et al.*, 2004; Goyagi *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2001; Popp *et al.*, 2011; Portiansky & González, 1995), a la vez que el tiempo transcurrido entre ambas inyecciones fue superior a las utilizadas en los protocolos citados.

Tomados en conjunto, puede aceptarse que la inyección intraparenquimatosa de lidocaína al 0,5 % reduce significativamente los efectos nocivos del KA, cuando ambos se inyectan en forma simultánea. Sin embargo, la inyección intracisternal única y aislada de 0,5 % lidocaína, aplicada 72 h después de la inyección intraparenquimatosa de 1 mM KA, no sería efectiva como preventivo del daño ante la acción del KA.

Serán necesarios estudios complementarios que permitan profundizar en los hallazgos observados, así como también aclarar el mecanismo de acción involucrado en la ocurrencia de estos efectos protectores por parte de la lidocaína, y los mecanismos de muerte y supervivencia celular que se ponen en juego.

Conclusiones

Cuando creíamos que teníamos todas las
respuestas, de pronto, cambiaron todas
las preguntas.

Mario Benedetti.
Escritor y poeta uruguayo

4. CONCLUSIONES

- Los efectos de la inyección intraparenquimatosa del anestésico local lidocaína en la médula espinal, son dependientes de la concentración inyectada.
- La inyección intraparenquimatosa de 0,5 % lidocaína en la médula espinal de rata no ejerce efectos negativos sobre el desempeño funcional, sensitivo y motor de los animales.
- La inyección intraparenquimatosa de 0,5 % lidocaína en la médula espinal de rata no induce cambios histológicos aparentes ni altera el recuento neuronal.
- La inyección intraparenquimatosa de 0,5 % lidocaína en la médula espinal previene la disfunción motora y sensitiva en animales inyectados con el agente excitotóxico KA, cuando ambos agentes se aplican en forma simultánea.
- La inyección intraparenquimatosa de 0,5 % lidocaína en la médula espinal previene la muerte neuronal en animales inyectados con el agente excitotóxico KA, cuando ambos agentes se aplican en forma simultánea.
- La inyección de 0,5 % lidocaína en la cisterna magna, en forma posterior a la inyección intraparenquimatosa de KA no permitió observar cambios significativos en las funciones motoras y sensitivas de los animales, ni sobre las poblaciones celulares de la médula espinal, de acuerdo con el protocolo utilizado.

Referencias

Los libros seguirán siendo imprescindibles no solamente para la literatura, sino para cualquier circunstancia en la cual sea necesario leer cuidadosamente, recibir no sólo la información sino también especular y reflexionar sobre ella.

Umberto Eco.
Escritor y filósofo italiano.

5. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Aminoff MJ. Pharmacologic management of parkinsonism & other movement disorders. En: Katsung BG, Trevor AJ. 2015. Basic and Clinical Pharmacology, Decimotercera edición. New York, Mc Graw Hill Education, pp. 472-89.
- 2- Andalib S, Vafae MS, Gjedde A. 2014. Parkinson's disease and mitochondrial gene variations: A review. *Journal of the Neurological Sciences*. 346(1-2):11-9.
doi: 10.1016/j.jns.2014.07.067.
- 3- Badger JL, Cordero-Llana O, Hartfield EM, Wade-Martins R. 2014. Parkinson's disease in a dish—Using stem cells as a molecular tool. *Neuropharmacology*. 76 Pt A:88-96.
doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.035.
- 4- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ceyzeriat K, Escartin C. 2015. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9:278.
doi: 10.3389/fncel.2015.00278.
- 5- Bisla K, Tanelian DL. 1992. Concentration-dependent effects of lidocaine on corneal epithelial wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 33(11):3029-33.
- 6- Bradbury MWB, Lathem W. 1965. A flow of cerebrospinal fluid along the central canal of the spinal cord of the rabbit and communications between this canal and the sacral subarachnoid space. *The Journal of Physiology*. 181(4):785-800.

- 7- Bräu ME, Nau C, Hempelmann G, Vogel W. 1995. Local anesthetics potently block a potential insensitive potassium channel in myelinated nerve. *The Journal of General Physiology*. 105(4):485-505.
- 8- Brennan MP, Sinusas AJ, Horvath TL, Collins JG, Harding MJ. 2009. Correlation between body weight changes and postoperative pain in rats treated with meloxicam or buprenorphine. *Lab Animal* 38(3):87-93.
doi: 10.1038/labani0309-87.
- 9- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. 1994. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(6):2076-80.
- 10- Bosshard SC, Grandjean J, Schroeter A, Baltes C, Zeilhofer HU, Rudin M. 2012. Hyperalgesia by low doses of the local anesthetic lidocaine involves cannabinoid signalling: An fMRI study in mice. *Pain*. 153(7):1450-8.
doi: 10.1016/j.pain.2012.04.001.
- 11- Brodal P. Structure of the neuron and organization of nervous tissue. En: Brodal P. 2010. *The Central Nervous System*, Cuarta edición. New York, Oxford University Press, pp. 5-18.
- 12- Brodal P. The coverings of the brain and the ventricular system. En: Brodal P. 2010. *The Central Nervous System*. Cuarta edición. New York, Oxford University Press, pp. 97-103.
- 13- Brül A, Christensen EI, Geneser F, Qvortrup K, Trandum-Jensen J. Tejido nervioso. En: Geneser *Histología*. 2015. Cuarta edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, pp.315-62.

- 14- Calvo AC, Manzano R, Mendonça DMF, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. 2014. Amyotrophic lateral sclerosis: A focus on disease progression. *BioMed Research International*. 2014:925101.
doi: 10.1155/2014/925101.
- 15-Carpenter MB & Sutin J (a). Médula espinal: Anatomía macroscópica y estructura interna. En: Carpenter MB & Sutin J. 1990. *Neuroanatomía Humana*, Sexta edición. Argentina, Librería “El Ateneo” Editorial, pp. 210-41.
- 16-Carpenter MB & Sutin J (b). Haces de la médula espinal. En: Carpenter MB & Sutin J. 1990. *Neuroanatomía Humana*, Sexta edición. Argentina, Librería “El Ateneo” Editorial, pp. 242-89.
- 17- Carter RB. 1991. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. *Pain*. 47:211-20.
- 18- Castanedo-Vazquez D, Bosque-Varela P, Sainz-Pelayo A, Riancho J. 2018. Infectious agents and amyotrophic lateral sclerosis: another piece of the puzzle of motor neuron degeneration. *Journal of Neurology*.
doi: 10.1007/s00415-018-8919-3.
- 19- Catterall WA y Mackie K. Anestésicos Locales. En: Goodman y Gilman. 2007. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. Undécima edición. México, Mc Graw Hill, pp. 309-86.
- 20- Chelly J, Kouyoumdjian JC, Mouillé P, Huchet A-M, Schmitt H. 1979. Effects of L-glutamic acid and kainic acid on central cardiovascular control. *European Journal of Pharmacology*. 60(1):91-4.
- 21- Cherng C-H, Wong C-S, Wu C-T, Yeh C-C. 2011. Glutamate release and neurologic impairment after intrathecal administration of lidocaine and bupivacaine in the rat. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 36(5):452-6.
doi: 10.1097/AAP.0b013e318228cdb0.

- 22- Chiu KM, Lu CW, Lee MY, Wang MJ, Lin TY, Wang SJ. 2016. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of lidocaine in kainic acid-injected rats. *Neuroreport*. 27(7):501-7.
doi: 10.1097/WNR.0000000000000570.
- 23- Chung K y Deisseroth K. 2013. CLARITY for mapping the nervous system. *Nature Methods*. 10(6):50813.
doi: 10.1038/nmeth.2481.
- 24- Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K. 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 497(7449):332-7.
doi: 10.1038/nature12107.
- 25- Coates JR, March PA, Oglesbee M, Ruaux CG, Olby NJ, Berghaus RD, O'Brien DP, Keating JH, Johnson GS, Williams DA. 2007. Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 21(6):1323-31.
- 26- Compston A y Coles A. 2008. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 372(9648):1502-17.
doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- 27- Congdon EE y Sigurdsson EM. 2018. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*.
doi: 10.1038/s41582-018-0013-z.
- 28- da Costa RC. 2010. Cervical spondylomyelopathy (Wobbler Syndrome) in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 40(5):881-913.

doi: 10.1016/j.cvsm.2010.06.003.

29- de Lahunta A & Glass E. Development of the nervous system: Malformation. En: de Lahunta A & Glass E. 2009. Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology, Tercera edición. St. Louis, Missouri, Saunders. Elsevier. pp. 23-37.

30- Dib B. 1984. Intrathecal chronic catheterization in the rat. Pharmacology Biochemistry and Behaviour. 20:45-8.

31- Diener PS y Bregman BS. 1998. Fetal spinal cord transplant support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. Journal of Neuroscience. 18(2):763-78.

32- Doan LV, Eydlin O, Piskoun B, Kline RP, Recio-Pinto E, Rosenberg AD, Blanck TJJ, Xu F. 2014. Despite differences in cytosolic calcium regulation, lidocaine toxicity is similar in adult and neonatal rat dorsal root ganglia *in vitro*. Anesthesiology. 120(1):50-61.

doi: 10.1097/ALN.0b013e3182a2a561.

33- Dong XX, Wang Y, Qin ZH. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacologica Sinica. 30(4):379-87.

doi: 10.1038/aps.2009.24.

34- Drasner K. Local Anesthetics. En: Katsung BG. 2015. Basic and Clinical Pharmacology, Decimotercera edición. New York, Mc Graw Hill Education. pp. 440-54.

35- Dusart I, Marty S, Peschanski M. 1991. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS -- II. Astrocytes. Neuroscience. 45(3):541-9.

- 36- Dyce KM & Molenaar GJ. El sistema nervioso. En: Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG, Rodríguez Veiga E, Camón Urgel J. 1999. Anatomía Veterinaria, Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana, pp. 281-350.
- 37- Evans HE. 1993. Anatomy of the dog. Tercera edición. Philadelphia, Saunders.
- 38- Fedder C, Beck-Schimmer B, Aguirre J, Hasler M, Roth-Z'graggen B, Uner M, Kalberer S, Schlicker A, Votta-Velis G, Bonvini JM, Graetz K, Borgeat A. 2010. *In vitro* exposure of human fibroblasts to local anaesthetics impairs cell growth. Clinical & Experimental Immunology. 162(2):280-8.
doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04252.x.
- 39- Federici T, Hurtig CV, Burks KL, Riley JP, Krishna V, Miller BA, Sribnick EA, Miller JH, Grin N, Lamanna JJ, Boulis NM. 2012. Surgical technique for spinal cord delivery of therapies: demonstration of procedure in gottingen minipigs. Journal of Visualized Experiments. 7(70):e4371.
- 40- Fletcher D, Mackenzie D, Villouta E. 2005. Modelling skewed data with many zeros: A simple approach combining ordinary and logistic regression. Environmental and Ecological Statistics. 12:45-54.
- 41- Franz CK, Federici T, Yang J, Backus C, Oh SS, Teng Q, Carlton E, Bishop KM, Gasmi M, Bartus RT, Feldman EL, Boulis NM. 2009. Intraspinal cord delivery of IGF-I mediated by adeno-associated virus 2 is neuroprotective in a rat model of familial ALS. Neurobiology of Disease. 33(3):473-81.
- 42- Frosch MP, Anthony DC, De Girolami U. The Central Nervous System. En: Kumar V, Abbas AK, Aster JC. 2015. Robbins y Cotran Pathologic Basis of Disease, Novena edición. Philadelphia, Elsevier Saunders, pp. 1251-1317.

- 43- Gallos G, Jones DR, Nasr SH, Emala CW, Lee HT. 2004. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology*. 101(4):902-11.
- 44- Godoy JA, Rios JA, Zolezzi JM, Braidy N, Inestrosa NC. 2014. Signaling pathway cross talk in Alzheimer's disease. *Cell Communication and Signaling*. 28; 12:23.
doi: 10.1186/1478-811X-12-23.
- 45- Gold MS, Reichling DB, Hampl KF, Drasner K, Levine JD. 1998. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 285(2):413-21.
- 46- Goyagi T, Nishikawa T, Tobe Y, Masaki Y. 2009. The combined neuroprotective effects of lidocaine and dexmedetomidine after transient forebrain ischemia in rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 53(9):1176-83.
doi: 10.1111/j.1399-6576.2009.01976.
- 47- Grant G & Robertson B. Primary Afferent Projections to the Spinal Cord. En: Paxinos G. 2004. *The Rat Nervous System*, Tercera edición. San Diego, California, USA., Elsevier Academic Press, pp. 111-19.
- 48- Grant G y Koerber HR. Spinal Cord Cytoarchitecture. En: Paxinos G. 2004. *The Rat Nervous System*, Tercera edición. San Diego, California, USA., Elsevier Academic Press, pp. 121-28.
- 49- Gray JA y Nicoll RA. Introduction to the pharmacology of CNS drugs. En: Katsung BG, Trevor AJ. 2015. *Basic and Clinical Pharmacology*, Decimotercera edición. New York, Mc Graw Hill Education, pp. 355-368.
- 50- Greenstein B & Greenstein A. Color Atlas of Neuroscience. Neuroanatomy and Neurophysiology. 2000. New York, Thieme Stuttgart, pp. 2-10; 84-85.

- 51- Hadi B, Zhang YP, Burke DA, Shields CB, Magnuson DSK. 2000. Lasting paraplegia caused by loss of lumbar spinal cord interneurons in rats: no direct correlation with motor neuron loss. *Journal of Neurosurgery*. 93(2 Suppl):266-75.
- 52- Hall R & Murdoch J. 1990. Brain protection: Physiological and pharmacological considerations. Part II: The pharmacology of brain protection. *Canadian Journal of Anaesthesia*. 37(7):762-77.
- 53- He B & Nan G. 2016. Neuronal regeneration after acute spinal cord injury in adult rats. *The Spine Journal*. 16(12):1459-1467.
- 54- Hirst RA, Gosai B, Rutman A, Andrew PW, O'Callaghan C. 2003. *Streptococcus pneumoniae* damages the ciliated ependyma of the brain during meningitis. *Infection and Immunity*. 71(10):6095-100.
- 55- Hollmann MW & Durieux ME. 2000. Local anesthetics and the inflammatory response. *Anesthesiology*. 93(3):858-75.
- 56- Ikonomidou C, Qin Y, Labruyere J, Olney JW. 1996. Motor neuron degeneration induced by excitotoxin agonists has features in common with those seen in the SOD-1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 55(2):211-24.
- 57- Ineichen BV, Schnell L, Gullo M, Kaiser J, Schneider MP, Mosberger AC, Good N, Linnebank M, Schwab ME. 2016. Direct, long-term intrathecal applications of therapeutics to the rodents CNS. *Nature Protocols*. 12:104-131.
- 58- Jejurikar SS, Welling TH, Zelenock JA, Gordon D, Burkel WE, Carlson BM, Messina LM. 1997. Induction of angiogenesis by lidocaine and basic fibroblast growth factor: a model for *in vivo* retroviral-mediated gene therapy. *Journal of Surgical Research*. 67(2):137-46.

- 59- Johnson ME, Saenz JA, DaSilva AD, Uhl CB, Gores GJ. 2002. Effect of local anesthetic on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model. *Anesthesiology*. 97(6):1466-76.
- 60- Johnson ME, Uhl CB, Spittler K-H, Wang H, Gores GJ. 2004. Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. *Anesthesiology*. 101(5):1184-94.
- 61- Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. 2005. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomedical Research*. 26(6):231-9.
- 62- Karussis D. 2014. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *Journal of Autoimmunity*. 48-49:134-42.
doi: 10.1016/j.jaut.2014.01.022.
- 63- Kenward, M. G. & Roger, J.H. 1997. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*. 53(3):983-97.
- 64- Kuwajima T, Sitko AA, Bhansali P, Jurgens C, Guido W, Mason C. 2013. ClearT: a detergent and solvent free clearing method for neuronal and non neuronal tissue. *Development*. 140(6):13648.
doi: 10.1242/dev.091844.
- 65- Koberne AI, Evans DE, LeGrys DC, Yaffe LJ, Bradley ME. 1984. Effect of intravenous lidocaine on experimental spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*. 60(3):595-601.
- 66- Kuzhandaivel A, Nistri A, Mladinic M. 2010. Kainate-mediated excitotoxicity induces neuronal death in the rat spinal cord in vitro via a PARP-1 dependent cell death pathway (Pathanatos). *Cellular and Molecular Neurobiology*. 30(7):1001-12.

doi: 10.1007/s10571-010-9531-y.

67- Lee R, Nitta T, Schmid RA, Schuessler RB, Harris KM, Gay WA Jr. 1998. Retrograde infusion of lidocaine or L-arginine before reperfusion reduces myocardial infarct size. *The Annals of Thoracic Surgery*. 65(5):1353-9.

68- Leffler A, Fischer MJ, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Sauer SK, Gavva NR, Reeh PW, Nau C. 2008. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *The Journal of Clinical Investigation* 118(2):763-76.

doi: 10.1172/JCI32751.

69- Lei B, Cottrell JE, Kass IS. 2001. Neuroprotective effect of low-dose lidocaine in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Anesthesiology*. 95(2):445-51.

70- Lenfant F, Lahet J-J, Chaillot B, Freysz M. 2004. The protective effects of lidocaine on human erythrocytes stored for seven days at 04 °C. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 9(2):301-4.

71- Lepore AC, Haenggeli C, Gasmi M, Bishop KM, Bartus RT, Maragakis NJ, Rothstein JD. 2007. Intraparenchymal spinal cord delivery of adeno-associated virus IGF-1 is protective in the SOD1^{G93A} model of ALS. *Brain Research*. 1185:256-65.

72- Lévesque M & Avoli M. 2013. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 37(10 Pt 2):2887-99.

doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.011.

73- Lin T-Y, Chung C-Y, Lu C-W, Huang S-K, Shieh J-S, Wang S-J. 2013. Local anesthetics inhibit glutamate release from rat cerebral cortex synaptosomes. *Synapse*. 67:568–579.

- 74- Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*. 76(4):1216-31.
- 75-Liu SS & McDonald SB. 2001. Current issues in spinal anesthesia. *Anesthesiology*. 94(5):888-906.
- 76- Liu F, Schafer DP, McCullough LD. 2009. TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal Neuroscience Methods*. 179(1):1-8.
- 77- Lucas LF, West CA, Rigor BM, Schurr A. 1989. Protection against cerebral hypoxia by local anesthetics: a study using brain slices. *Journal of Neuroscience Methods*. 28(1-2):47-50.
- 78- Luukko M, Kontinen Y, Kempainen P, Pertovaara A. 1994. Influence of various experimental parameters on the incidence of thermal and mechanical hyperalgesia induced by a constriction mononeuropathy of the sciatic nerve in lightly anesthetized rats. *Experimental Neurology* 128(1):143-54.
doi: 10.1006/exnr.1994.1122.
- 79- Magnuson DSK, Trinder TC, Zhang YP, Burke D, Morassutti DJ, Shields CB. 1999. Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Experimental Neurology*. 156(1):191-204.
- 80- Mahiques JC; Elicabe RL; Koler RI; Laguens RM; Portiansky EL. 2000. Therapeutic uses of known ester and amide compounds. United States patent. Patent number: 6,140,371.
- 81- Malet A, Faure M-O, Deletage N, Pereira B, Haas J, Lambert G. 2015. The comparative cytotoxic effects of different local anesthetics on a human neuroblastoma cell line. *Anesthesia & Analgesia*. 120(3):589-96.
doi: 10.1213/ANE.0000000000000562.

- 82- Mazzone GL, Margaryan G, Kuzhandaivel A, Nasrabad SE, Mladinic M, Nistri A. 2010. Kainate-induced delayed onset of excitotoxicity with functional loss unrelated to the extent of neuronal damage in the *in vitro* spinal cord. *Neuroscience*. 168(2):451-62.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.055.
- 83- Mazzone GL & Nistri A. 2011. Delayed neuroprotection by riluzole against excitotoxic damage evoked by kainate on rat organotypic spinal cord cultures. *Neuroscience*. 190:318-27.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.013.
- 84- Mazzone GL, Veeraraghavan P, Gonzalez-Inchauspe C, Nistri A, Uchitel OD. 2017. ASIC channel inhibition enhances excitotoxic neuronal death in an *in vitro* model of spinal cord injury. *Neuroscience*. 343:398-410.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.12.008.
- 85- Mezensky D, Flesarova S, Sulla I. 2017. Arterial blood supply to the spinal cord in animal models of spinal cord injury. A review. *Anatomical Record (Hoboken)*. 300(12):2091-2106.
doi: 10.1002/ar.23694.
- 86- McGill R, Tukey JW, Larsen WA. 1978. Variations of Box Plots. *The American Statistician*. 32(1):12-16.
- 87- Mescher AL. *Nerve Tissue & the Nervous System*. En: Mescher AL. 2016. *Junqueira's Basic Histology*, Decimocuarta edición. New York. Mc Graw Hill Education, pp. 161-91.
- 88- Metz GA & Whishaw IQ. 2002. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *Journal of Neuroscience Methods*. 115(2):169-79.

- 89- Metz GA & Whishaw IQ. 2009. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *Journal of Visualized Experiments*. 12;(28). pii:1204.
- 90- Milano J, Oliveira SM, Rossato MF, Sauzem PD, Machado P, Beck P, Zanatta N, Martins MAP, Mello CF, Rubin MA, Ferreira J, Bonacorso HG. 2008. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *European Journal of Pharmacology*. 581:86-96.
- 91- Miller AD & Zachary JF. Nervous System. En: Zachary JF. 2017. *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*, Sexta edición. St. Louis, Missouri, Elsevier, pp. 805-907.
- 92- Mitchell SJ. 2001. Lidocaine in the treatment of decompression illness: a review of the literature. *Undersea & Hyperbaric Medical Society*. 28(3):165-74.
- 93- Mitra NK, Goh TEW, Krishnan TB, Nadarajah VD, Vasavaraj AK, Soga T. 2013. Effect of intra-cisternal application of kainic acid on the spinal cord and locomotor activity in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 6:1505-15.
- 94- Mohammed HO, Divers TJ, Kwak J, Omar AH, White ME, de Lahunta A. 2012. Association of oxidative stress with motor neuron disease in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 73(12):1957-62. doi: 10.2460/ajvr.73.12.1957.
- 95- Morrison BM, Shu I-W, Wilcox AL, Gordon JW, Morrison JH. 2000. Early and selective pathology of light chain neurofilament in the spinal cord and sciatic nerve of G86R mutant superoxide dismutase transgenic mice. *Experimental Neurology*. 165(2):207-20.

- 96- Muguruma T, Sakura S, Saito Y. 2006. Epidural lidocaine induces dose-dependent neurologic injury in rats. *Anesthesia & Analgesia*. 103(4):876-81.
- 97- Nardone R, Höller Y, Taylor AC, Lochner P, Tezzon F, Golaszewski S, Brigo F, Trinka E. 2016. Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology (Jena)*. 119(1):64-73.
doi: 10.1016/j.zool.2015.09.003.
- 98- Nardone R, Florea C, Höller Y, Brigo F, Versace V, Lochner P, Golaszewski S, Trinka E. 2017. Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. *Zoology (Jena)*. 123:101-114.
doi: 10.1016/j.zool.2017.06.004.
- 99- Nishida F, Morel GR, Hereñú CB, Schwerdt JI, Goya RG, Portiansky EL. 2011. Restorative effect of intracerebroventricular insulin-like growth factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience*. 177:195-206.
- 100- Nishida F. 2014a. Estudio morfológico de poblaciones celulares de la médula espinal de ratas inoculadas con diferentes neurotoxinas. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
- 101- Nishida F; Barbeito J; Barbeito CG; Portiansky EL. 2014b. Is the vertebral canal prepared to host the aged spinal cord? A morphometric assessment. *Zoomorphology*. 133:219-225.
- 102- Nishida F, Zanuzzi CN, Marquez M, Barbeito CG, Portiansky EL. 2014c. La trepanación vertebral como un método alternativo para la inoculación intraparenquimatosa de diversas suspensiones dentro de la médula espinal. *Analecta Veterinaria*. 34(1-2):11-17.
- 103- Nishida F, Zanuzzi CN, Martínez A, Barbeito CG, Portiansky EL. 2015. Functional and histopathological changes induced by intraparenchymal

injection of kainic acid in the rat cervical spinal cord. *Neurotoxicology*. 49; 68-78.

104- Nishida F, Sisti MS, Zanuzzi CN, Barbeito CG, Portiansky EL. 2017. Neurons of the rat cervical spinal cord express vimentin and neurofilament after intraparenchymal injection of kainic acid. *Neuroscience Letters*. 643:103-110.

doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.029.

105- Olby N. 2004. Motor neuron disease: inherited and acquired. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 34(6):1403-18. 106- Olschewski A, Schnoebel-Ehehalt R, Li Y, Tang B, Braü ME, Wolff M. 2009. Mexiletine and lidocaine suppress the excitability of dorsal horn neurons. *Anesthesia & Analgesia*. 109(1):258-64.

doi: 10.1213/ane.0b013e3181a3d5d8.

107- Pearse DD, Lo TP, Cho KS, Lynch MP, Garg MS, Marcillo AE, Sanchez AR, Cruz Y, Dietrich WD. 2005. Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*. 22(6):680-702.

108- Peluffo H, Foster E, Ahmed SG, Lago N, Hutson TH, Moon L, Yip P, Wanisch K, Caraballo-Miralles V, Olmos G, Lladó J, McMahon SB, Yáñez-Muñoz RJ. 2013. Efficient gene expression from integration-deficient lentiviral vectors in the spinal cord. *Gene Therapy*. 20(6):645-57.

109- Penkowa M, Florit S, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Carrasco J, Hidalgo J. 2005. Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *Journal of Neuroscience Research*. 79(4):522-34.

- 110- Pentyala S, Hughes E, Mysore P, Mishra S, Miller J, Rahman A, Urbanczyk K. 2012. Effect of lidocaine on bone matrix formation by osteoblasts. *Journal of Anesthesiology and Clinical Science*.
doi: <http://dx.doi.org/10.7243/2049-9752-1-1>
- 111- Pereda AE. 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*. 15(4):250-63.
doi: 10.1038/nrn3708.
- 112- Plitman E, Nakajima S, de la Fuente-Sandoval C, Gerretsen P, Chakravarty MM, Kobylanskii J, Chung JK, Caravaggio F, Iwata Y, Remington G, Graff-Guerrero A. 2014. Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: A review. *European Neuropsychopharmacology*. 24(10):1591-605.
doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.07.015.
- 113- Popp SS, Lei B, Kelemen E, Fenton AA, Cottrell JE, Kass IS. 2011. Intravenous antiarrhythmic doses of lidocaine increase the survival rate of CA1 neurons and improve cognitive outcome after transient global cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*. 192:537-49.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.086.
- 114- Portiansky EL & González PH. 1995. Protective effect of lidocaine in the experimental foot-and-mouth disease pancreatitis. *Experientia*. 51(11):1060-2.
- 115- Portiansky EL, Barbeito CG, Goya RG, Gimeno EJ, Zuccolilli GO. 2004. Morphometry of cervical segments grey matter in the male rat spinal cord. *Journal of Neuroscience Methods*. 139(2):217-29.
- 116- Probert AW, Borosky S, Marcoux FW, Taylor CP. 1997. Sodium channel modulators prevent oxygen and glucose deprivation injury and glutamate release in rat neocortical cultures. *Neuropharmacology*. 36(8):1031-8.

- 117- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO. 2004. *Invitación a la neurociencia*. Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- 118- Queen JP, Coughlan AR, May C, Bennett D, Penderis J. 1998. Management of disc-associated wobbler syndrome with a partial slot fenestration and position screw technique. *Journal of Small Animal Practice*. 39(3):131-6.
- 119- Quinteros Villaruel E, Borda E, Sterin-Borda L, Orman B. 2011. Lidocaine-induced apoptosis of gingival fibroblasts: participation of cAMP and PKC activity. *Cell Biology International*. 35(8):783-8.
doi: 10.1042/CBI20100200.
- 120- Quinteros Villaruel E, Orman B, Borda E. 2014. Lidocaine induced cell growth on human gingival fibroblasts. Role of Na⁺-K⁺-ATPase and PKC activities. *Pharmacology & Pharmacy*. 5, 796-805.
- 121- Rahmanzadeh R, Brück W, Minagar A, Sahraian MA. 2018. Multiple sclerosis pathogenesis: missing pieces of an old puzzle. *Reviews in the Neurosciences*. pii: /j/revneuro.ahead-of-print/revneuro-2018-0002/revneuro-2018-0002.xml.
doi: 10.1515/revneuro-2018-0002.
- 122- Rao SD & Weiss JH. 2004. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends in Neurosciences*. 27(1):17-23.
- 123- Rosenzweig ES & McDonald JW. Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Current Opinion in Neurology*. 17(2):121-31.
- 124- Sabilallah M, Fontanaud P, Linck N, Boussadia B, Peyroutou R, Lasgouzes T, Rassendren A, Marchi N, Hirbec H. 2016. Evidence for status epilepticus

and pro-inflammatory changes after intranasal kainic acid administration in mice. *PLoS One*. 11(3):e0150793.

doi: 10.1371/journal.pone.0150793.

125- Sasaki N, Imamura Y, Sekiya A, Itoh M, Furuoka H. 2016. Four cases of equine motor neuron disease in Japan. *Journal of Equine Science*. 27(3):119-124.

126- Schepers RJ & Ringkamp M. 2010. Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 177-184.

doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.10.003.

127- Searle SR. 1971. *Linear models*. New York: Wiley.

128- Sedý J, Urdzíkova L, Jendelová P, Syková E. 2008. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 32(3):550-80.

129- Šerý O, Povová J, Míšek I, Pešák L, Janout V. 2013. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathologica*. 51 (1): 1-9.

doi: 10.5114/fn.2013.34190.

130- Shaw G, Yang C, Ellis R, Anderson K, Mickle JP, Scheff S, Pike B, Anderson DK, Howland H. 2005. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 336(4):1268-77.

131- Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. 2014. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*. 114:25-57.

doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.002.

- 132- Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. 1993. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB₄ release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 37:159–65.
- 133- Snyder BR, Gray SJ, Quach ET, Huang JW, Leung CH, Samulski RJ, Boulis NM, Federici T. 2011. Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Human Gene Therapy*. 22(9):1129-35.
- 134- Standaert DG & Young AB. Tratamiento de los trastornos degenerativos del sistema nervioso central. En: Goodman y Gilman. 2006. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (editores), Undécima edición. México, Mc Graw Hill, pp. 527-46.
- 135- Su D, Gu Y, Wang Z, Wang X. 2010. Lidocaine attenuates proinflammatory cytokine production induced by extracellular adenosine triphosphate in cultures rat microglia. *Anesthesia & Analgesia*. 111(3):768-74. doi: 10.1213/ANE.0b013e3181e9e897.
- 136- Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. 2010. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Tercera edición. Hoboken, New Jersey, USA, Wiley & Sons, Inc. pp. 1-17.
- 137- Taylor CP, Burke SP, Weber ML. 1995. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *Journal of Neuroscience Methods*. 59(1):121-8.
- 138- Teasell RW, Mehta S, Aubut J-AL, Foulon B, Wolfe DL, Hsieh JTC, Townson AF, Short C, Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence Research Team. 2010. A systematic review of pharmacologic treatments of pain after

spinal cord injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 91(5):816-31.

doi: 10.1016/j.apmr.2010.01.022.

139- Terada H, Ohta S, Nishikawa T, Mizunuma T, Iwasaki Y, Masaki Y. 1999. The effect of intravenous or subarachnoid lidocaine on glutamate accumulation during transient forebrain ischemia in rats. *Anesthesia & Analgesia*. 89(4):957-61.

140- Tobe M, Obata H, Suto T, Yokoo H, Nakazato Y, Tabata Y, Saito S. 2010. Long-term effect of sciatic nerve block with slow-release lidocaine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 112:1473-81.

141- Tomer R, Ye L, Hsueh B, Deisseroth K. 2014. Advanced CLARITY for rapid and high resolution imaging of intact tissues. *Nature Protocols*. 9(7):168297. doi: 10.1038/nprot.2014.123.

142- Tracey D. Ascending and Descending Pathways in the Spinal Cord. En: Paxinos G. 2004. *The Rat Nervous System*, Tercera edición. San Diego, California, USA, Elsevier Academic Press. pp. 149-64.

143- Treede R-D, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. 1995. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *The Journal of Physiology*. 483.3, 747–758.

144- Turner AL & Perry MS. 2017. Outside the box: Medications worth considering when traditional antiepileptic drugs have failed. *Seizure*. 50:173-185.

doi: 10.1016/j.seizure.2017.06.022.

145- van Eick AJ. 1967. A change in the response of the mouse in the “hot plate” analgesia-test, owing to a central action of atropine and related compounds. *Acta Physiologica et Pharmacologica Neerlandica*. 14:499-500.

- 146- Wang D, Wu X, Li J, Xiao F, Liu X, Meng M. 2002. The effect of lidocaine on early postoperative cognitive dysfunction after coronary artery bypass surgery. *Anesthesia & Analgesia*. 95(5):1134-41.
- 147- Weber ML y Taylor CP. 1994. Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is prevented by tetrodotoxin, lidocaine and phenytoin without blockade of action potentials. *Brain Research* 664(1-2):167-77.
- 148- Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, Hermanns, Essmann F, Hollmann MW, Bauer I, Stevens MF. 2009. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *British Journal of Anaesthesia*. 103(5):711-8.
doi: 10.1093/bja/aep236.
- 149- Witiw CD & Fehlings MG. 2015. Acute spinal cord injury. *Journal of Spinal Disorders & Techniques*. 28(6):202-10.
doi: 10.1097/BSD.0000000000000287.
- 150- Yuan T, Li Z, Li X, Yu G, Wang N, Yang X. 2014. Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglia. *Journal of Surgical Research*. 192(1):150-62.
doi: 10.1016/j.jss.2014.05.023.
- 151- Zhang, X., S. Zhang, J. P. Manyat Nantha-Aree, N. Buckley, U. Shahzad, J. Cheng, J. DeBeer, M. Winemaker, D. Wismer, D. Punthakee, V. Avram, L. Thabane. 2014. Empirical comparison of four baseline covariate adjustment methods in analysis of continuous outcomes in randomized controlled trials. *Clinical Epidemiology*. 6: 227–235.
- 152- Zhang X-M & Zhuo J. 2011. Kainic acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Current Neuropharmacology*. 9(2):388-98.

doi: 10.2174/157015911795596540.

153- Zheng H & Rinaman L. 2015. Simplified CLARITY for visualizing immunofluorescence labelling in the developing rat brain. *Brain Structure & Function*. 221(4):237583.

doi: 10.1007/s0042901510200.

154- Zhuo M. 2017. Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. *Neuropharmacology*. 112(Pt A):228-234.

doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.014.

Anexo

¿Qué puedo decirte que te pueda ser
útil, excepto que tal vez estás
buscando algo con tanta insistencia
que consigues no encontrar nada?

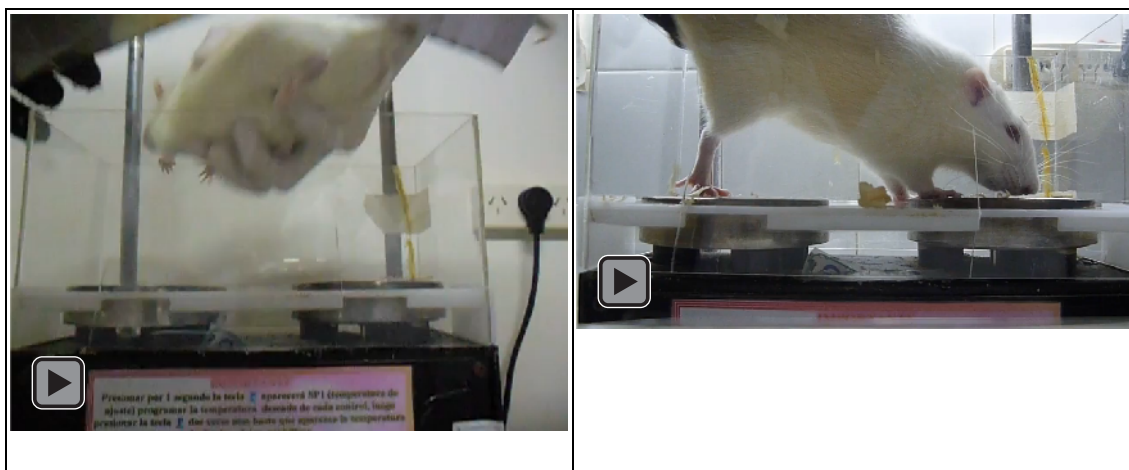
Hermann Hesse
Escritor alemán.

ANEXO 1

A1.1 Pruebas comportamentales

A1.1.1 Prueba de sensibilidad al calor

En los videos adjuntos correspondientes se puede apreciar que el animal del grupo KA1 mantiene el miembro torácico derecho apoyado sobre la platina caliente y aún cuando cambia de posición sobre la misma, no demuestra signos de sensibilidad al calor; mientras que el animal del grupo KA1L05 rápidamente retira su miembro torácico derecho de la superficie caliente.



Video A1.1¹. Video de la prueba de sensibilidad al calor de un animal del grupo KA1 (izquierda) y de un animal del grupo KA1L05 (derecha), en el día 3 pi, correspondientes a los respectivos videos.

A1.1.2 Prueba de suspensión en el aire

En el video adjunto correspondiente se podrá observar el desarrollo de la prueba de suspensión en el aire en un animal control. Se observa cómo el animal se mantiene suspendido gracias a sus miembros torácicos.

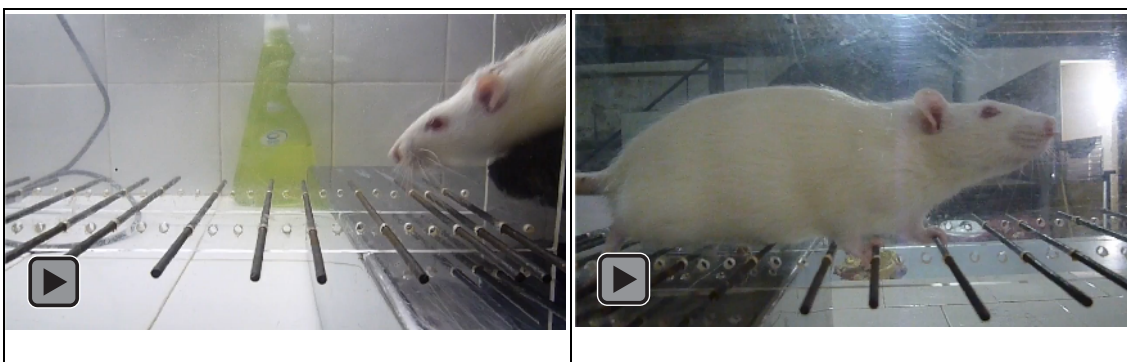
¹ Todos los videos pueden ser visualizados en el entorno de Acrobat Reader® 9.0 o posterior



Video A1.2. Video correspondiente a un animal control, durante la ejecución de la prueba de suspensión en el aire.

A1.1.3 Desplazamiento en escalera horizontal

En los videos adjuntos correspondientes se puede apreciar a animales de los grupos KA1 y KA1L05 en su desplazamiento a través de la escalera horizontal. Se puede apreciar que el animal inyectado con ácido kaínico no logra apoyar el miembro torácico derecho, el cual mantiene suspendido durante toda la prueba, mientras que el animal del grupo KA1L05 puede utilizar este miembro y su marcha no se ve afectada significativamente.



Video A1.3. Videos de la prueba de desplazamiento en escalera horizontal de un animal del grupo KA1 (izquierda) y de un animal del grupo KA1L05 (derecha), en el día 3 pi, correspondientes a los respectivos videos.

A1.2 Ausencia de interacción química entre el KA y la lidocaína

El análisis cromatográfico de la solución KA1L1, mostró un pico de $t_r=2,75$ min (**Fig. A1.4**), que correspondía a dos sustancias, una de $t_r=2,68$ (lidocaína) y otra de $t_r=2,50$ (KA).

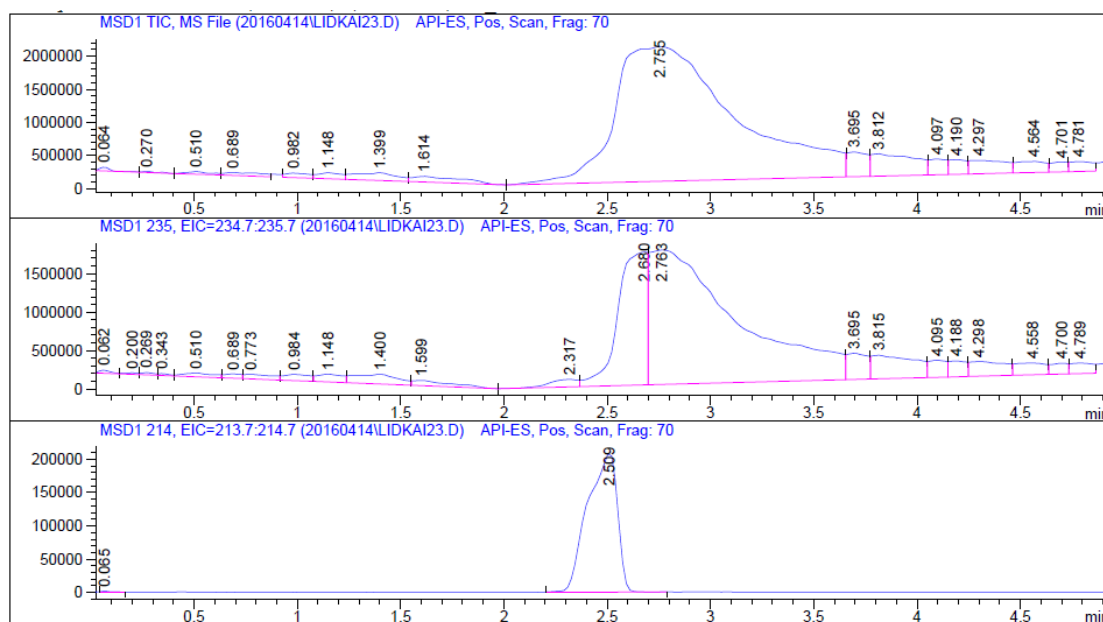


Figura A1.4. Cromatograma de la solución KA1L1. El pico original de $t_r=2,75$ min se desdobló como 2 picos con $t_r=2,68$ min y $t_r=2,50$ min, correspondientes a lidocaína y KA, respectivamente.

El análisis cromatográfico de la solución KA1L2, mostró un pico de $t_r=2,70$ min (**Fig. A1.5**), que correspondía a dos sustancias, una de $t_r=2,69$ (lidocaína) y otra de $t_r=2,43$ (KA).

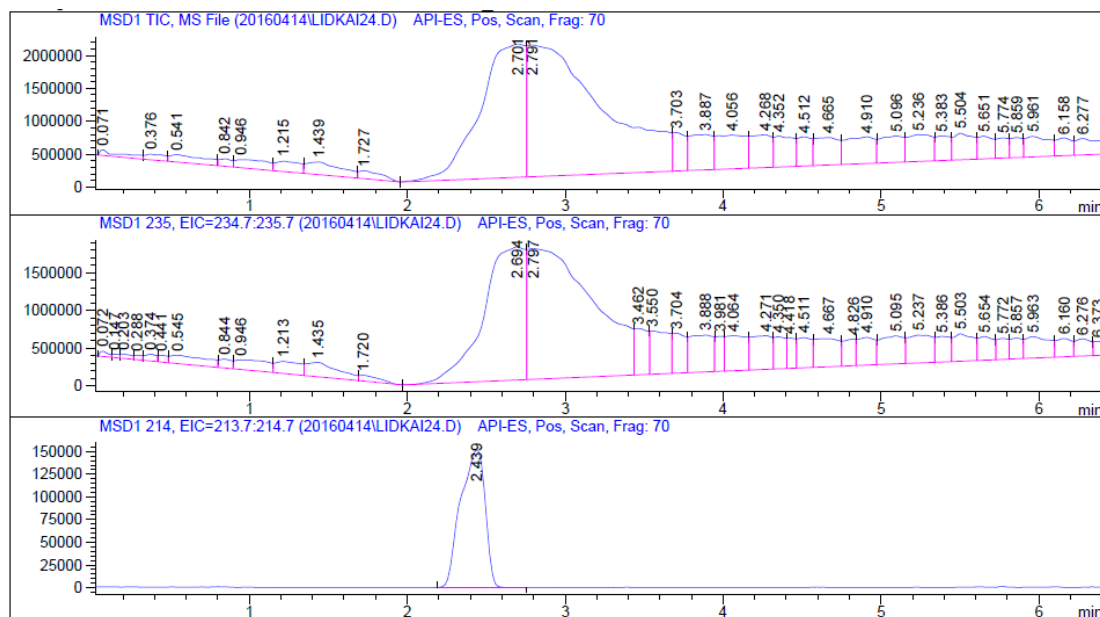


Figura A1.5. Cromatograma de la solución KA1L2. El pico original de $t_r=2,70$ min se desdobló como 2 picos con $t_r=2,69$ min y $t_r=2,43$ min, correspondientes a lidocaína y KA, respectivamente.

A1.3 Análisis morfométrico

A1.3.1 Etapa 1

A1.3.1.1 Región dorsal

Se hallaron diferencias significativas entre las áreas neuronales de los diferentes grupos para todos los días pi, tanto para la hemimédula ipsilateral como para la contralateral (**Fig A1.6**). En el lado ipsilateral, el grupo L2 mostró las mayores áreas promedio para los días 2, 3 y 14 pi, mientras que el grupo L1 mostró el mayor valor al día 7 pi; en todos los casos dichos valores fueron significativamente mayores a los valores mostrados por el grupo control. El grupo L05 por su parte, mostró valores significativamente menores a los del grupo control en los días 1 y 2 pi, mientras que en los días sucesivos no se registraron diferencias significativas entre los valores de ambos grupos. En el

lado contralateral, el grupo L2 registró los mayores valores en los días 2, 3 y 14 pi, siendo éstos significativamente mayores a los del grupo control.

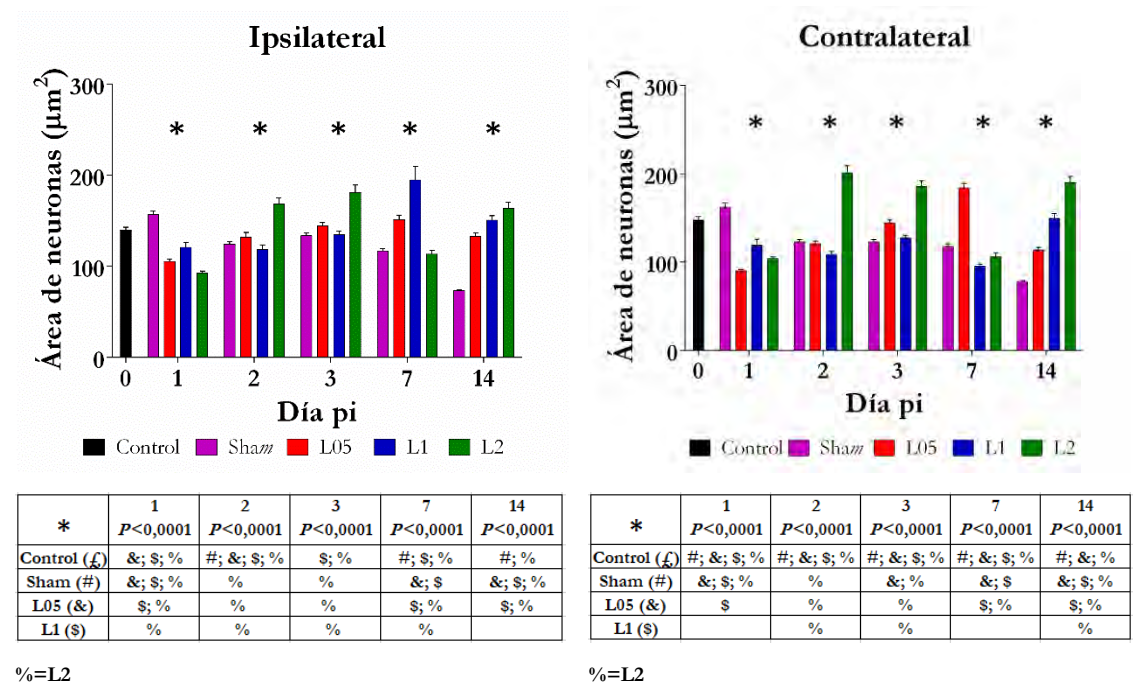
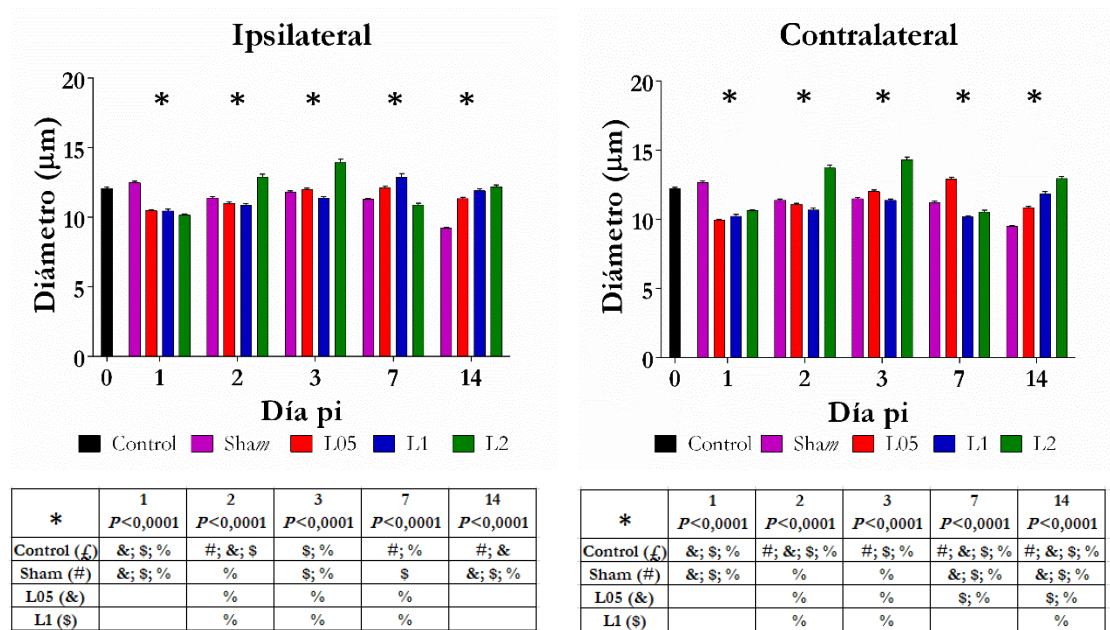


Figura A1.6. Izquierda. Arriba: Áreas de neuronas para la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM. **Derecha. Arriba:** Áreas de neuronas para la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Al analizar los diámetros de las neuronas, se hallaron diferencias significativas para todos los días pi, tanto para la hemimédula ipsilateral como para la contralateral (**Fig A1.7**). El diámetro promedio de las neuronas del grupo L2, en el lado ipsilateral fue el mayor y, significativamente diferente del resto de los grupos para los días 2 y 3 pi. Los grupos L1 y L05 mostraron inicialmente valores significativamente menores a los del grupo control, pero con el correr de los días se situaron alrededor de los valores exhibidos por este grupo. Del lado contralateral, se observó un comportamiento similar con el grupo L2 alcanzando los mayores valores en los días 2 y 3 pi.



%=L2

Figura A1.7. Izquierda. Arriba: Diámetros de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

%=L2

Derecha. Arriba: Diámetros de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Para los perímetros de las neuronas se hallaron diferencias significativas para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig A1.8**). El grupo L2 mostró el mayor perímetro promedio de sus neuronas en los días 2, 3 y 14 pi para ambos lados, mientras que el grupo L1 tuvo un aumento al día 7 pi que se observó en el lado ipsilateral pero no en el contralateral. El grupo L05 mostró inicialmente valores menores a los del grupo control, que aumentaron hacia los días 3 y 7 pi, para descender nuevamente al día 14 pi.

En cuanto al parámetro redondez, se hallaron diferencias significativas para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig A1.9**). El grupo L2 alcanzó su mayor valor al día 2 pi, en ambas hemimédulas, mientras que el grupo L1 alcanzó su valor máximo al día 7 pi del lado ipsilateral; siendo ambos grupos significativamente mayores que todos los demás grupos en dichos días pi. El

comportamiento del grupo L05 fue similar al observado para los demás parámetros.

El parámetro diámetro feret mostró diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambos lados (**Fig A1.10**). En la hemimédula ipsilateral y en los días 2 y 3 pi, el diámetro feret del grupo L2 fue significativamente mayor que el del resto de los grupos, mientras que al día 14 pi fue significativamente mayor al de los grupos control, sham y L05. En la hemimédula contralateral, el diámetro feret del grupo L2 fue significativamente mayor que el del resto de los grupos en los días 2, 3 y 14 pi. El grupo L1 por su parte, mostró su valor máximo al día 7 pi y del lado ipsilateral, siendo significativamente diferente del resto de los grupos. El grupo L05 se comportó de forma semejante en ambas hemimédulas, con sus valores menores o similares a los del grupo control y con un máximo hacia el día 7 pi.

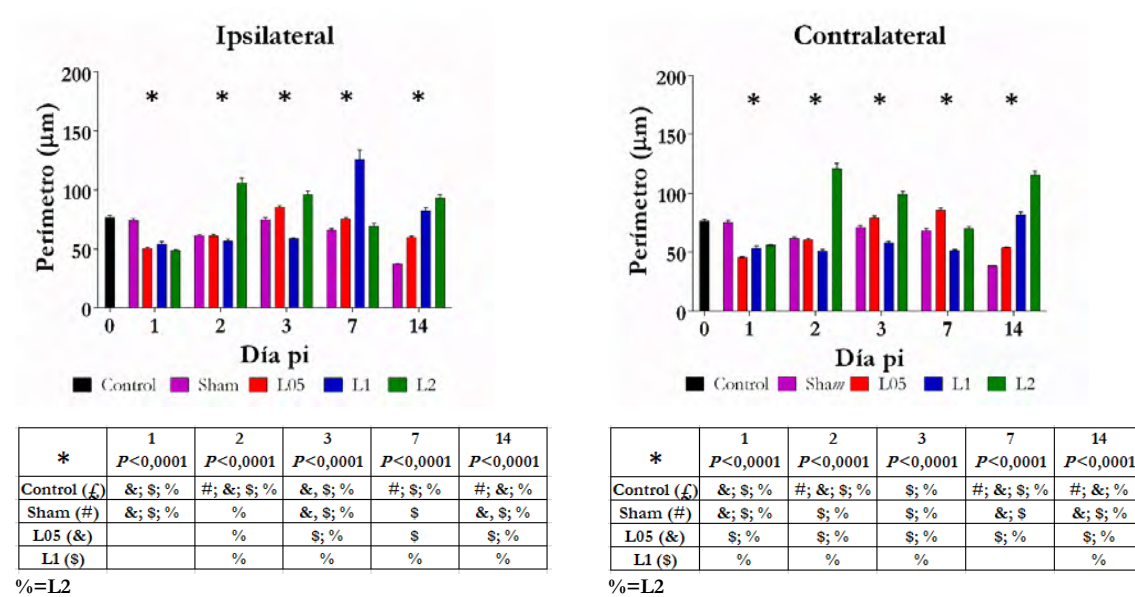
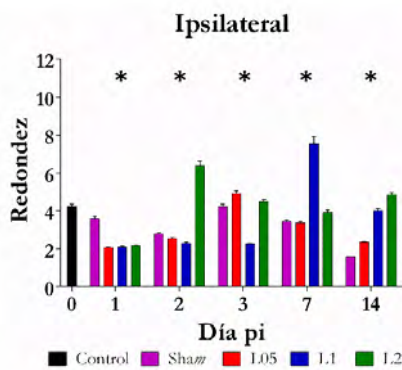


Figura A1.8. Izquierda. Arriba: Perímetro de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

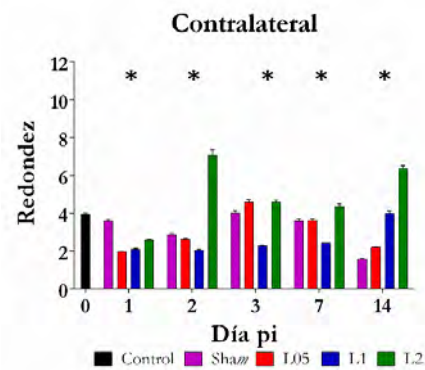
Derecha. Arriba: Perímetro de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (L)	#; &; \$; %	#; &; \$; %	&; \$; %	#; &; \$	#; &; %
Sham (#)	&; \$; %	\$; %	&; \$; %	\$	&; \$; %
L05 (&)		%	\$; %	\$; %	\$; %
L1 (\$)		%	%	%	%

%=L2

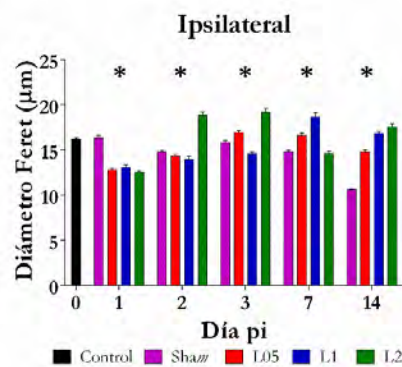
Figura A1.9. Izquierda. Arriba: Redondez de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (L)	&; \$; %	#; &; \$; %	&; \$; %		#; &; %
Sham (#)	&; \$; %	\$; %	&; \$; %		&; \$; %
L05 (&)	%	\$; %	\$	\$; %	\$; %
L1 (\$)		%	%		%

%=L2

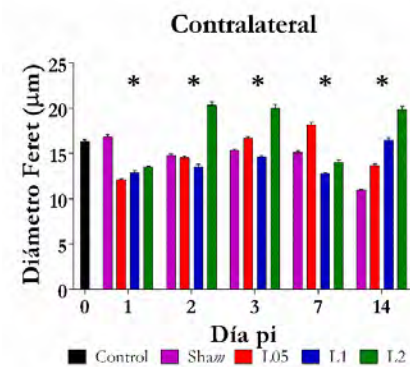
Derecha. Arriba: Redondez de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (L)	&; \$; %	#; &; \$; %	\$; %	#; \$; %	#; &
Sham (#)	&; \$; %	%	\$; %	&; \$	&; \$; %
L05 (&)		%	\$; %	%	\$; %
L1 (\$)		%	%	%	%

%=L2

Figura A1.10. Izquierda. Arriba: Diámetro feret de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (L)	&; \$; %	#; &; \$; %	\$; %	#; &; \$; %	#; &; %
Sham (#)	&; \$; %	\$; %	&; \$; %	&; \$; %	&; \$; %
L05 (&)		%	\$; %	\$; %	\$; %
L1 (\$)		%	%		%

%=L2

Derecha. Arriba: Diámetro feret de las neuronas para la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

A1.3.1.2 Región media

La comparación de las áreas neuronales entre los diferentes grupos resultó en diferencias significativas para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.11**). El grupo L2 mostró el mayor valor de las áreas promedio para los días 2, 3 y 14 pi, que fue significativamente mayor al de los demás grupos en la hemimédula ipsilateral, mientras que en la contralateral fue significativamente mayor a los demás grupos en los días 2 y 3 pi, y fue significativamente diferente de los grupos control y sham en el día 14 pi. El grupo L1 alcanzó su valor máximo al día 7 pi en ambas hemimédulas, mientras que para todos los días pi los valores de la hemimédula ipsilateral fueron superiores a los de la hemimédula contralateral. El grupo L05 mostró un incremento gradual de sus áreas promedio hasta alcanzar su valor máximo al día 7 pi en el lado ipsilateral.

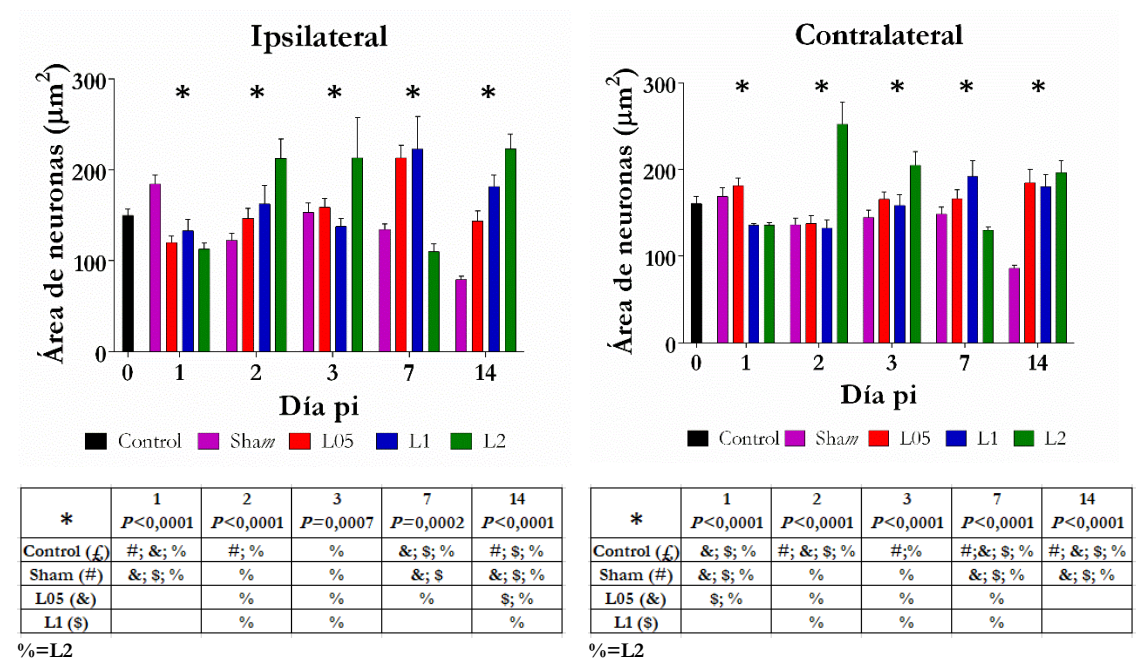


Figura A1.11. Izquierda. Arriba: Áreas de neuronas para la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Derecha. Arriba: Áreas de neuronas para la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

La comparación de los diámetros en la región medial mostró diferencias significativas para todos los días pi en la hemimédula ipsilateral, y para los días 2, 3 y 14 pi en la hemimédula contralateral (**Fig. A1.12**). El valor de los diámetros en el grupo L2 fue el máximo para los días 2, 3 y 14 pi en ambas hemimédulas. Los grupos L1 y L05 tuvieron su valor máximo al día 7 pi en el lado ipsilateral, mientras que del lado contralateral el grupo L1 también tuvo su máximo al día 7 pi y el grupo L05 mostró valores similares a los del grupo control.

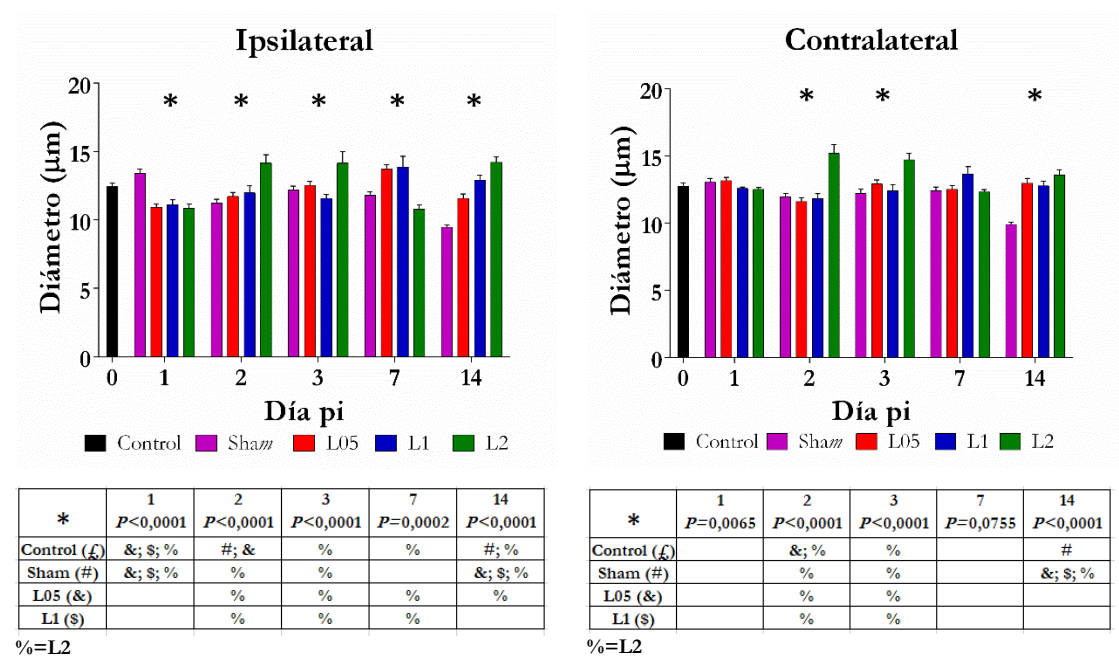


Figura A1.12. **Izquierda. Arriba:** Diámetros de las neuronas para la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM. **Derecha. Arriba:** Diámetros de las neuronas para la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

La comparación de los valores de los perímetros mostró diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi en ambas hemimédulas (**Fig. A1.13**). El comportamiento de los grupos fue semejante al observado para los parámetros anteriores, con los grupos L1 y L2 presentando los valores

Ipsilateral

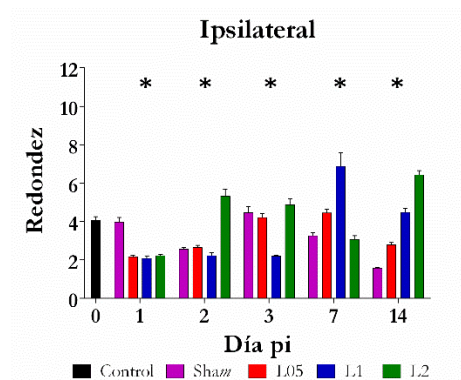
Día pi	Control	Sham	L05	L1	L2
0	~80	-	-	-	-
1	~88	~58	~58	~58	~58
2	~68	~62	~68	~68	~112
3	~85	~85	~85	~62	~105
7	~72	~72	~102	~132	~62
14	~42	~98	~72	~98	~128

Contralateral

Día pi	Control	Sham	L05	L1	L2
0	~78	-	-	-	-
1	~78	~72	~78	~58	~68
2	~68	~68	~62	~62	~132
3	~85	~85	~85	~68	~102
7	~72	~72	~78	~122	~72
14	~42	~98	~82	~98	~108

 $\% = L2$ $\%_0 = L2$

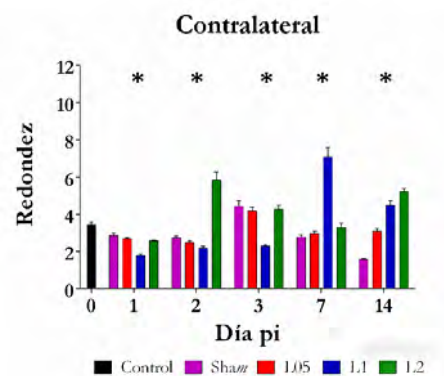
278



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (f)	&; \$; %	#; &; \$; %	\$; %	\$; %	#; &; %
Sham (#)	&; \$; %	\$; %	\$	&; \$	&; \$; %
L05 (&)		%	\$	%	\$; %
L1 (\$)		%	%	%	%

%=L2

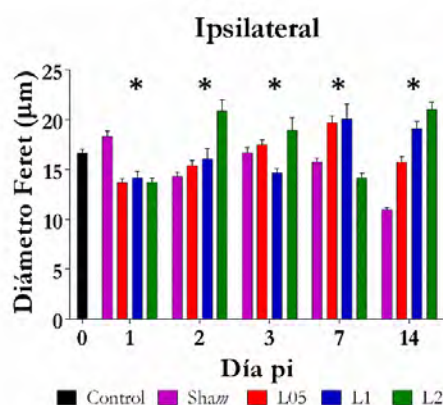
Figura A1.14. Izquierda. Arriba: Redondez de las neuronas para la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (f)	\$; %	\$; %	#; &; \$; %	\$	#; \$; %
Sham (#)	\$	\$; %	\$	\$	&; \$; %
L05 (&)	\$	%	\$	\$	\$; %
L1 (\$)	%	%	%	%	%

%=L2

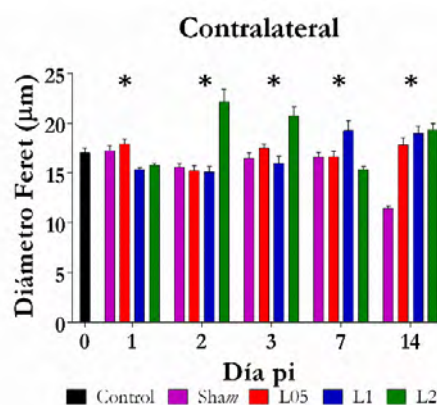
Derecha. Arriba: Redondez de las neuronas para la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (f)	&; \$; %	#; &; %	\$; %	&; \$; %	#; \$; %
Sham (#)	&; \$; %	%	\$; %	&; \$; %	&; \$; %
L05 (&)		%	\$; %	%	\$; %
L1 (\$)		%	%	%	%

%=L2

Figura A1.15. Izquierda. Arriba: Diámetro feret de las neuronas para la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
Control (f)	\$; %	#; &; \$; %	%	\$; %	#; \$; %
Sham (#)	\$; %	%	%	\$; %	&; \$; %
L05 (&)		%	%	\$	
L1 (\$)		%	%	%	

%=L2

Derecha. Arriba: Diámetro feret de las neuronas para la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

A1.3.2 Etapa 2

A1.3.2.1 Región dorsal

La comparación de las áreas neuronales demostró la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos para todos los días pi en el lado ipsilateral y para los días 1, 2, 7 y 14 pi en el lado contralateral (**Fig. A1.16**). El valor promedio de las áreas neuronales del grupo KA1 se incrementó a lo largo de los días pi (con excepción del día 7 pi) y fue superior al valor promedio del grupo KA1L05 para los días 2, 3, 7 y 14 pi en el lado ipsilateral. El grupo KA1L05 mostró valores cercanos a los del grupo L05 en la mayoría de los días pi para ambas hemimédulas.

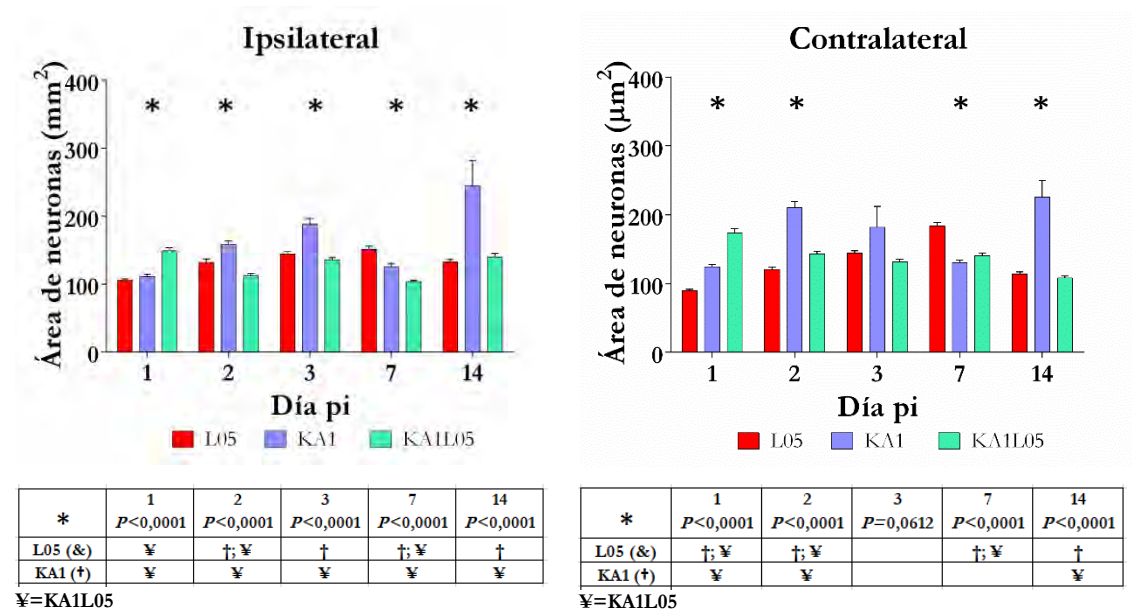


Figura A1.16. Izquierda. Arriba: Áreas de neuronas para la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Derecha. Arriba: Áreas de neuronas para la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

La comparación de los diámetros demostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas

(**Fig. A1.17**). En el lado ipsilateral el grupo KA1 mostró el mayor diámetro promedio para todos los días pi, mientras que el grupo KA1L05 tuvo valores menores a los del grupo L05 (excepto en el día 1 pi). En el lado contralateral, el diámetro promedio del grupo KA1 fue mayor al del grupo KA1L05 (con excepción del día 1 pi).

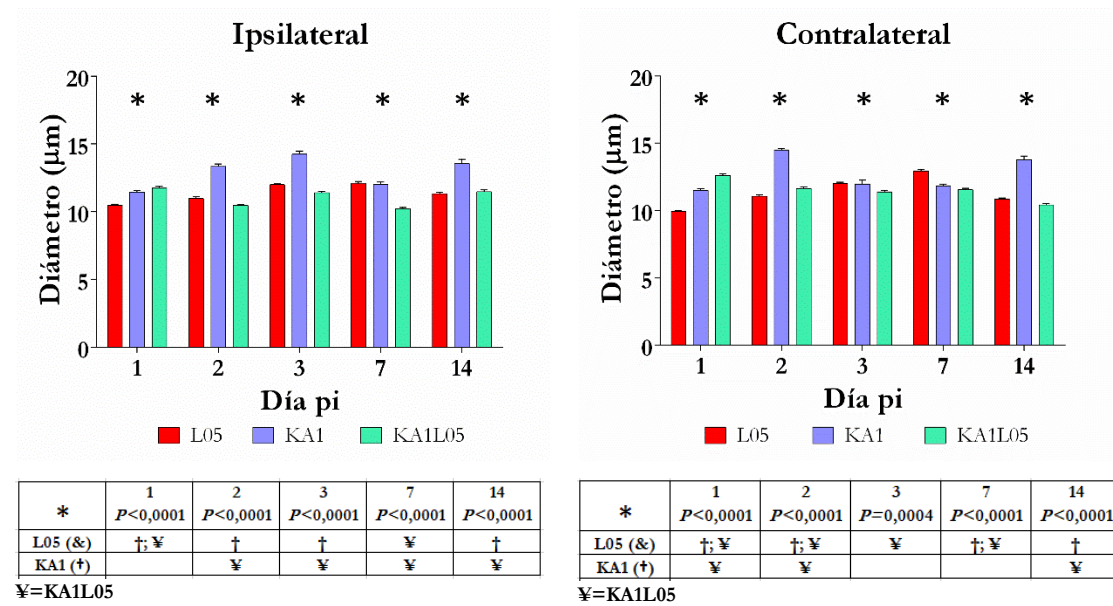


Figura A1.17. Izquierda. Arriba: Diámetro de neuronas para la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM. **Derecha. Arriba:** Diámetro de neuronas para la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

Para el parámetro perímetro se hallaron diferencias significativas para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.18**). El perímetro promedio del grupo KA1L05 mostró un máximo al día 1 pi, descendiendo luego en los días posteriores en ambas hemimédulas. El grupo KA1 alcanzó su valor máximo al día 3 pi en el lado ipsilateral y al día 2 pi en el lado contralateral.

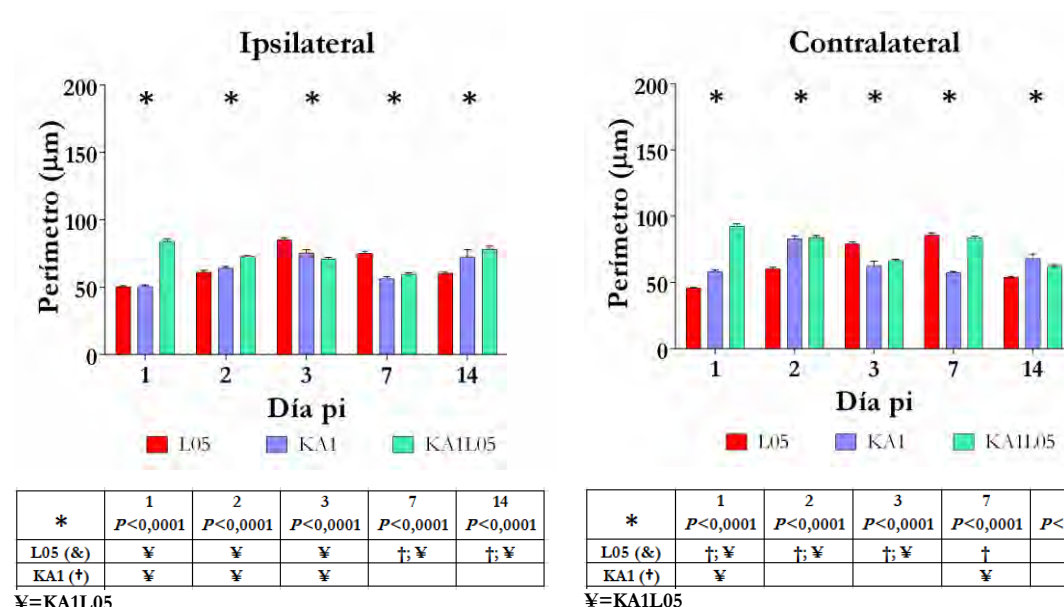
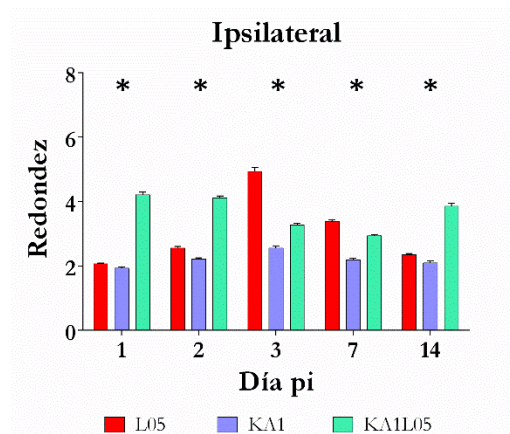


Figura A1.18. Izquierda. Arriba: Perímetro de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM. **Derecha. Arriba:** Perímetro de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

La comparación de la redondez para los diferentes grupos mostró diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi en ambas hemimédulas (**Fig. A1.19**). El grupo KA1L05 tuvo su valor máximo al día 1 pi en el lado ipsilateral, y al día 2 pi en el lado contralateral. El grupo KA1 tuvo su valor máximo al día 3 pi en el lado ipsilateral y al día 2 pi en el lado contralateral.

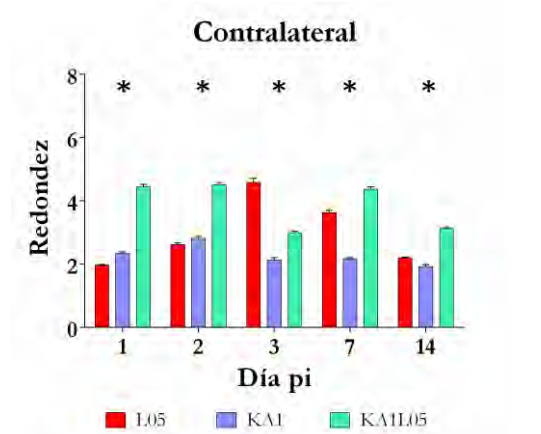
La comparación de los valores del diámetro feret mostró diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.20**). El grupo KA1L05 tuvo su máximo al día 1 pi en ambas hemimédulas, mientras que el grupo KA1 tuvo su máximo al día 3 pi en el lado ipsilateral y al día 2 pi en el lado contralateral.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
L05 (&)	¥	‡ ¥	‡ ¥	‡ ¥	†
KA1 (†)	¥	¥	¥	¥	¥

¥=KA1L05

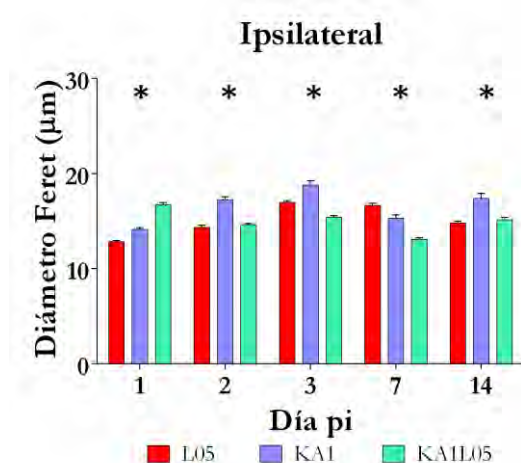
Figura A1.19. Izquierda. Arriba: Redondez de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
L05 (&)	‡ ¥	¥	‡ ¥	‡ ¥	‡ ¥
KA1 (†)	¥	¥	¥	¥	¥

¥=KA1L05

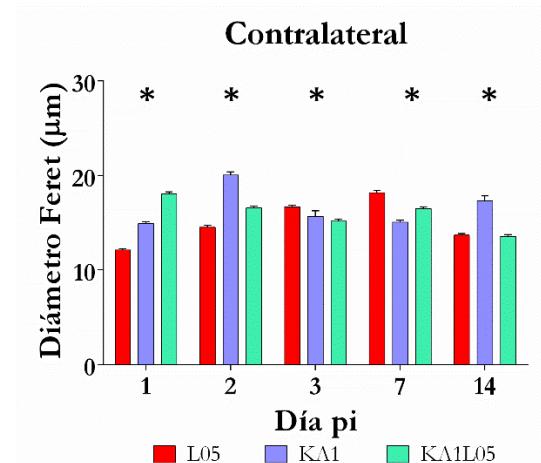
Derecha. Arriba: Redondez de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P=0,0022$
L05 (&)	‡ ¥	†	‡ ¥	‡ ¥	†
KA1 (†)	¥	¥	¥	¥	¥

¥=KA1L05

Figura A1.20 Izquierda. Arriba: Diámetro feret para las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
L05 (&)	‡ ¥	‡ ¥	¥	‡ ¥	†
KA1 (†)	¥	¥		¥	¥

¥=KA1L05

Derecha. Arriba: Diámetro feret para las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

A1.3.2.2 Región media

Para la comparación de las áreas neuronales se hallaron diferencias significativas entre los diferentes grupos para los días 3, 7 y 14 pi en el lado ipsilateral y para los días 1, 2, 7 y 14 pi en el lado contralateral (**Fig. A1.21**). El grupo KA1 tuvo un máximo al día 3 pi en el lado ipsilateral, y al día 2 pi en el lado contralateral. Los valores del grupo KA1L05 fueron más uniformes a lo largo de los días en ambas hemimédulas.

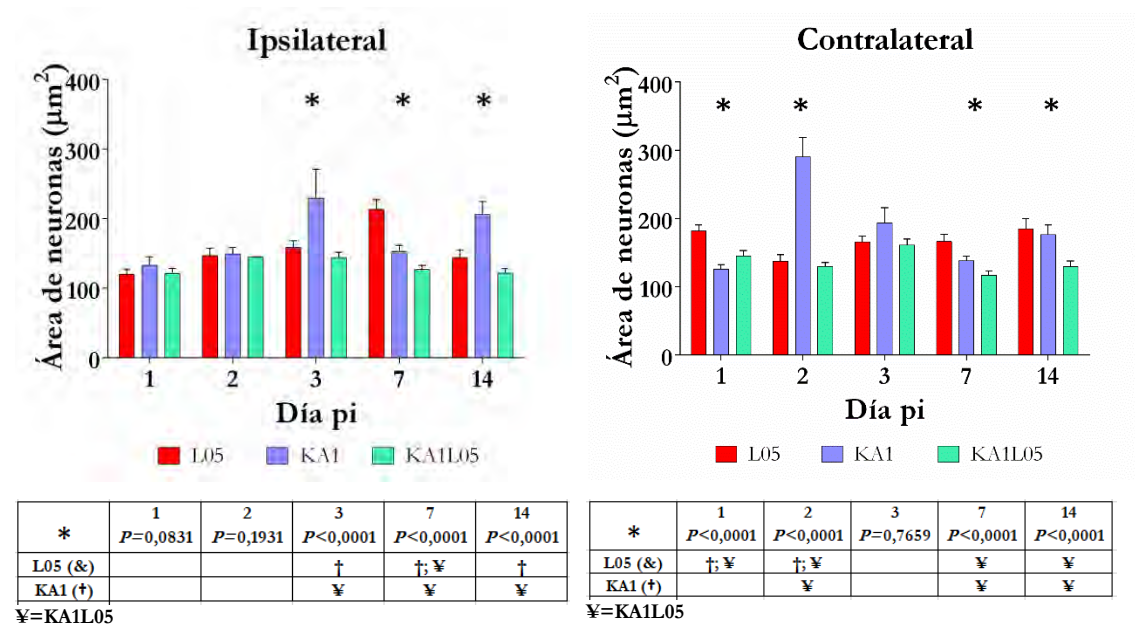
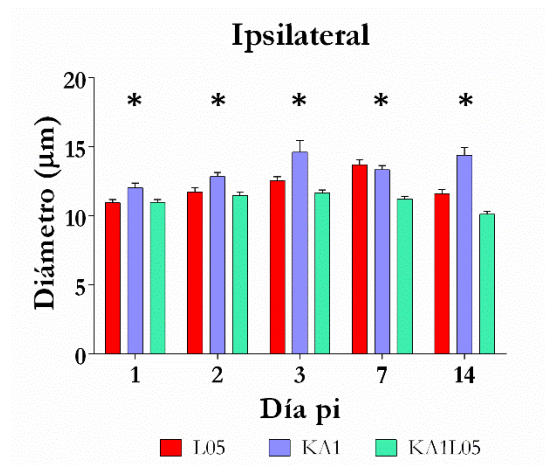


Figura A1.21. Izquierda. Arriba: Área de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Derecha. Arriba:** Área de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

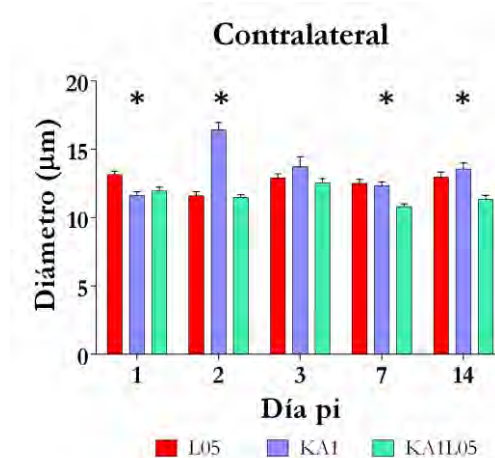
Para el parámetro diámetro se hallaron diferencias significativas para todos los días pi en ambas hemimédulas (**Fig. A1.22**). El diámetro promedio máximo para el grupo KA1 se observó al día 3 pi en el lado ipsilateral y al día 2 pi en el lado contralateral. Para el grupo KA1L05 el diámetro promedio máximo se observó en el día 1 pi, para ambas hemimédulas.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
L05 (&)	†; ¥	†	†	¥	†
KA1 (†)		¥	¥	¥	¥

¥=KA1L05

Figura A1.22 Izquierda. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.



*	1	2	3	7	14
	$P<0,0001$	$P<0,0001$	$P=0,0004$	$P<0,0001$	$P<0,0001$
L05 (&)	†; ¥	†; ¥	¥	†; ¥	†
KA1 (†)	¥	¥			¥

¥=KA1L05

Derecha. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

La comparación de los perímetros evidenció diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.23**). Al igual que para el diámetro, el perímetro promedio máximo del grupo KA1 se observó al día 3 pi en el lado ipsilateral y en el día 2 pi en el lado contralateral; mientras que el valor máximo para el grupo KA1L05 se observó en el día 2 pi para ambas hemimédulas.

En cuanto a la redondez, se hallaron diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.24**). El grupo KA1 tuvo su máximo al día 3 pi en el lado ipsilateral y en el día 2 pi en el lado contralateral. EL grupo KA1L05 tuvo su máximo en el día 2 pi en ambos lados.

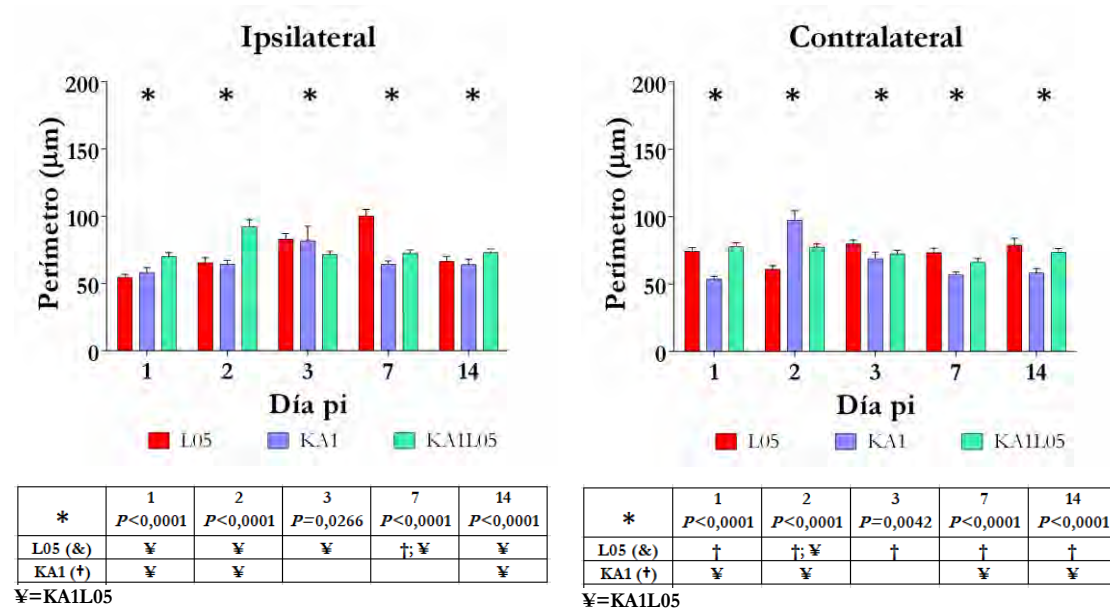


Figura A1.23. Izquierda. Arriba: Perímetro de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. Abajo: Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM. Derecha. Arriba: Perímetro de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. Abajo: Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

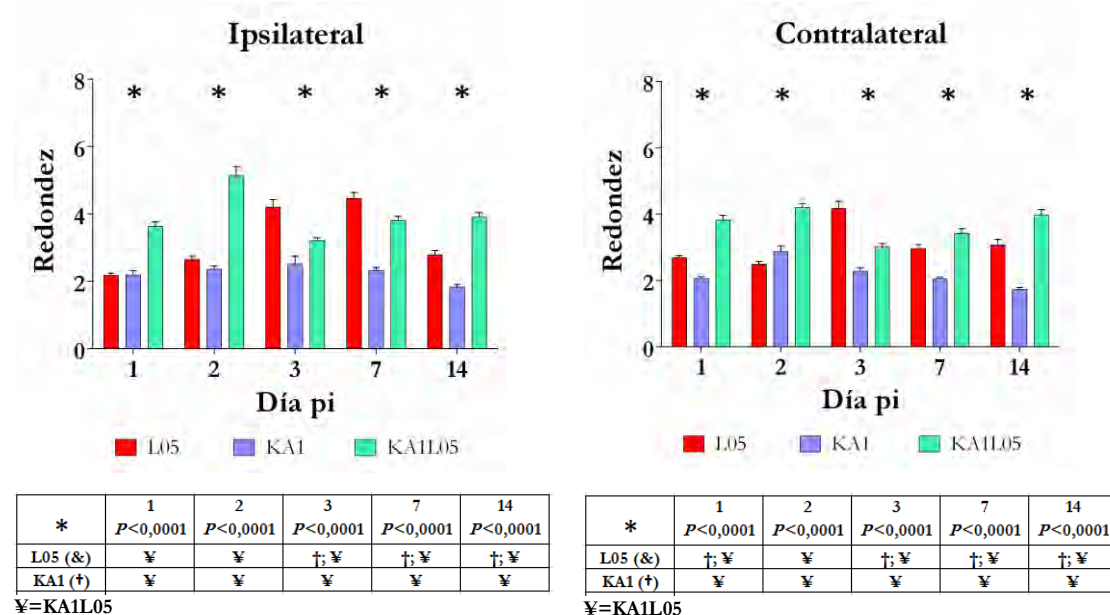


Figura A1.24. Izquierda. Arriba: Redondez de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. Abajo: Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM. Derecha. Arriba: Redondez de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. Abajo: Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM.

La comparación del diámetro feret entre los diferentes grupos permitió hallar diferencias significativas entre los grupos en todos los días pi para la hemimédula ipsilateral, y en los días 1, 2, 7 y 14 pi en la hemimédula contralateral (**Fig. A1.25**). El grupo KA1 tuvo su máximo en el día 3 pi en el lado ipsilateral y en el día 2 pi en el lado contralateral; mientras que el grupo KA1L05 tuvo su máximo en el día 2 pi en el lado ipsilateral y en el día 3 pi en el lado contralateral. Los valores del grupo KA1L05 fueron inferiores a los del grupo L05 en todos los días pi y en ambas hemimédulas (con excepción de los días 1 y 2 pi en la hemimédula ipsilateral).

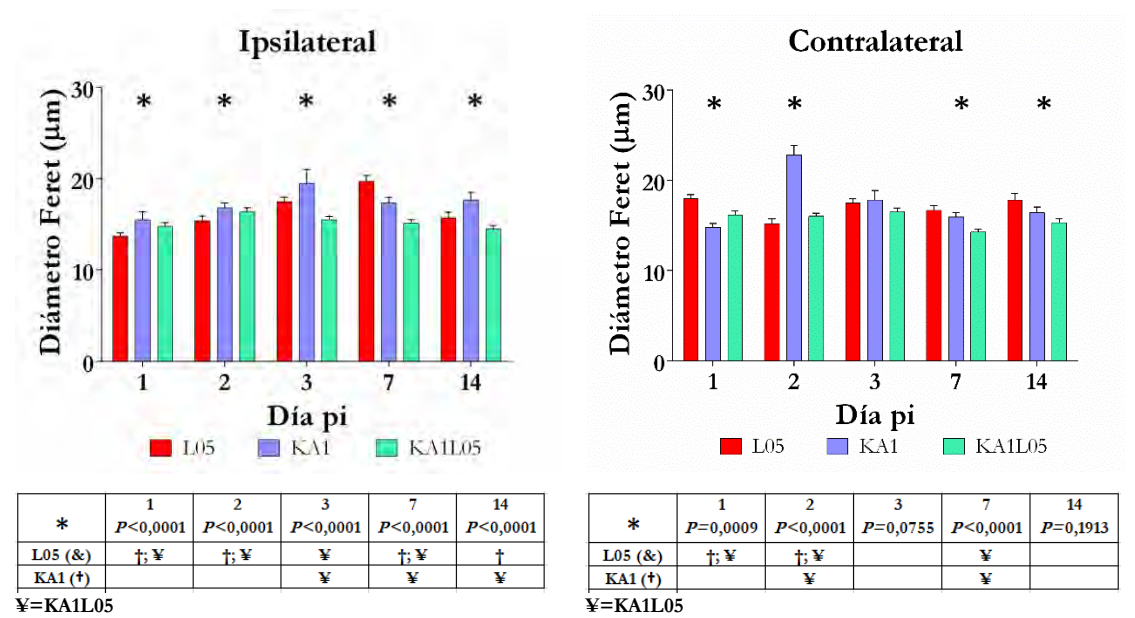


Figura A1.25. Izquierda. Arriba: Diámetro feret de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media ± SEM.

Derecha. Arriba: Diámetro feret de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **Abajo:** Tabla de diferencias significativas. Los datos se presentan como Media ± SEM.

A1.3.3 Etapa 2

A1.3.3.1 Región dorsal

La comparación de las áreas neuronales no permitió detectar diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.26**).

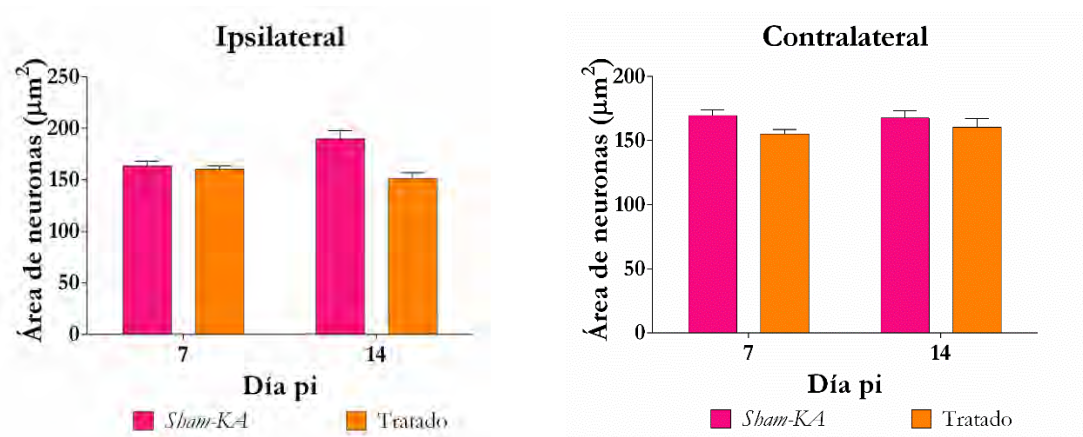


Figura A1.26. Izquierda: Área de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha: Área de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Para el parámetro diámetro no se hallaron diferencias significativas para todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.27**).

La comparación de los perímetros neuronales mostró diferencias significativas entre los grupos para los días 7 pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.28**). En ambos casos el valor promedio de los perímetros neuronales para el grupo *sham* fue significativamente mayor al día 7 pi en ambas hemimédulas.

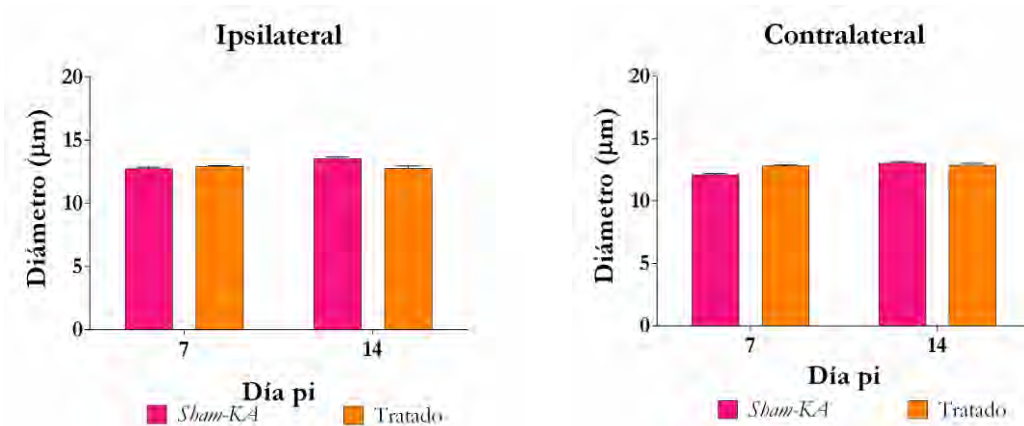


Figura A1.27. Izquierda: Diámetro de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha: Diámetro de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

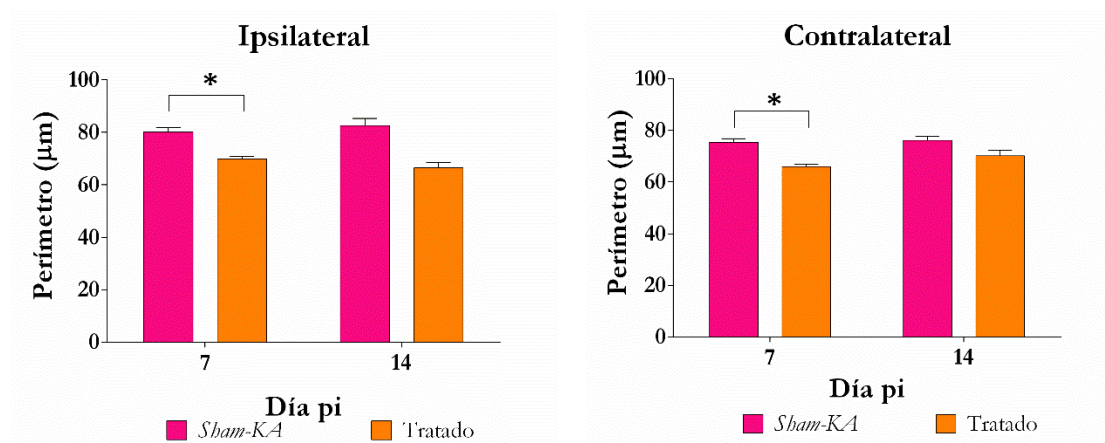


Figura A1.28. Izquierda: Perímetro de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **sham vs. tratado*. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

Derecha: Perímetro de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **sham vs. tratado*. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

El parámetro redondez determinó la existencia de diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi en la hemimédula ipsilateral y para el día 7 pi en la hemimédula contralateral (**Fig. A1.29**). Los grupos *sham* y tratado se comportaron de la misma forma para ambos días pi en el lado ipsilateral,

mientras que en el lado contralateral aumentaron su valor promedio hacia el día 14 pi.

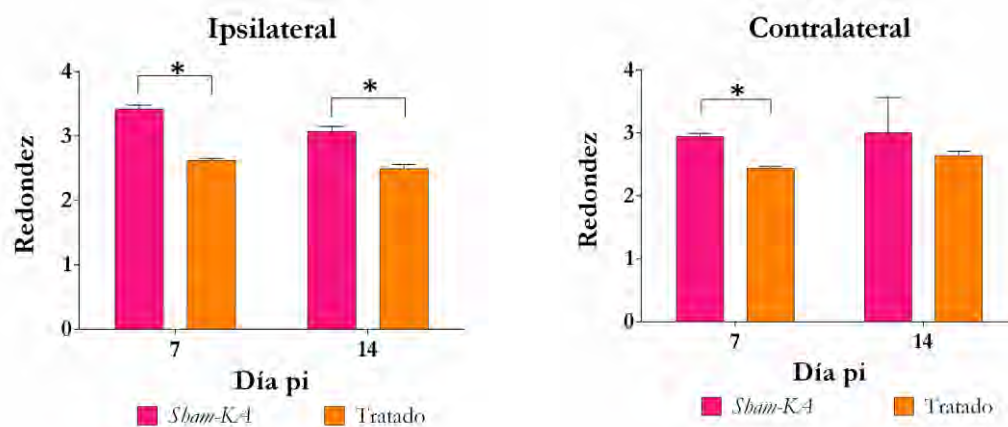


Figura A1.29. Izquierda: Redondez de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **sham vs. tratado*. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

Derecha: Redondez de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. **sham vs. tratado*. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

El diámetro feret no fue significativamente diferente entre los grupos para todos los días pi en ambas hemimédulas (**Fig. A1.30**). Para el grupo *sham* el valor promedio de diámetro feret fue mayor en el día 14 pi, en ambas hemimédulas. El grupo Tratado mostró una leve reducción de su diámetro feret promedio en el día 14 pi del lado ipsilateral, mientras que no se aprecian variaciones en sus valores del lado contralateral.

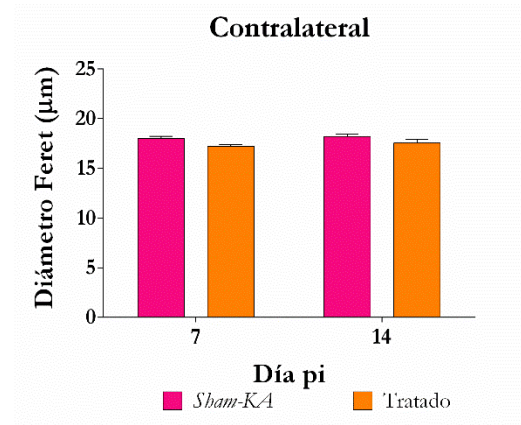
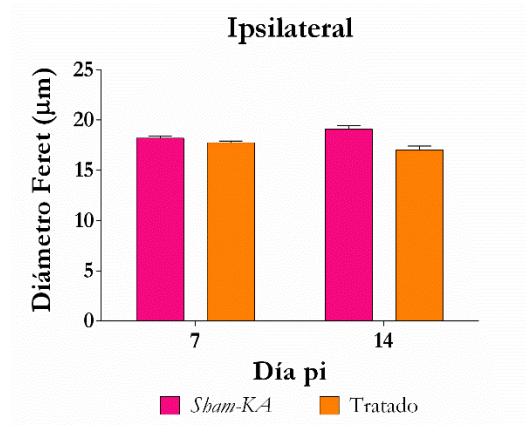


Figura A1.30. Izquierda: Diámetro feret de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha: Diámetro feret de las neuronas de la región dorsal de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

A1.3.3.2 Región media

La comparación de las áreas neuronales para la región media mostró diferencias significativas entre los grupos para el día 14 pi, en la hemimédula ipsilateral (**Fig. A1.31**). El área promedio de las neuronas se incrementó hacia el día 14 pi en el grupo *sham* en ambas hemimédulas. El área promedio de las neuronas del grupo Tratado mostraron un sutil incremento de su área promedio hacia el día 14 pi en ambas hemimédulas.

La comparación de los valores de los diámetros no mostró diferencias significativas entre los grupos en todos los días pi, en ambas hemimédulas (**Fig. A1.32**).

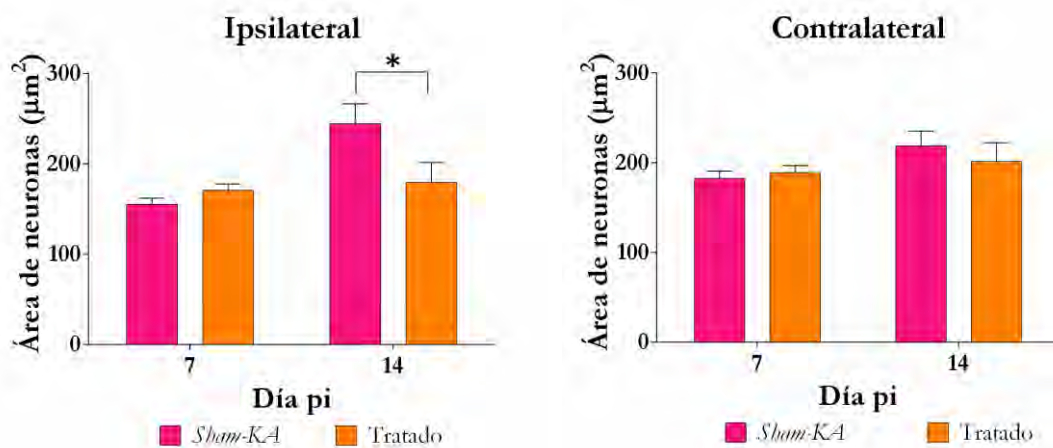


Figura A1.31. Izquierda: Área de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **sham vs. tratado*. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

Derecha: Área de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

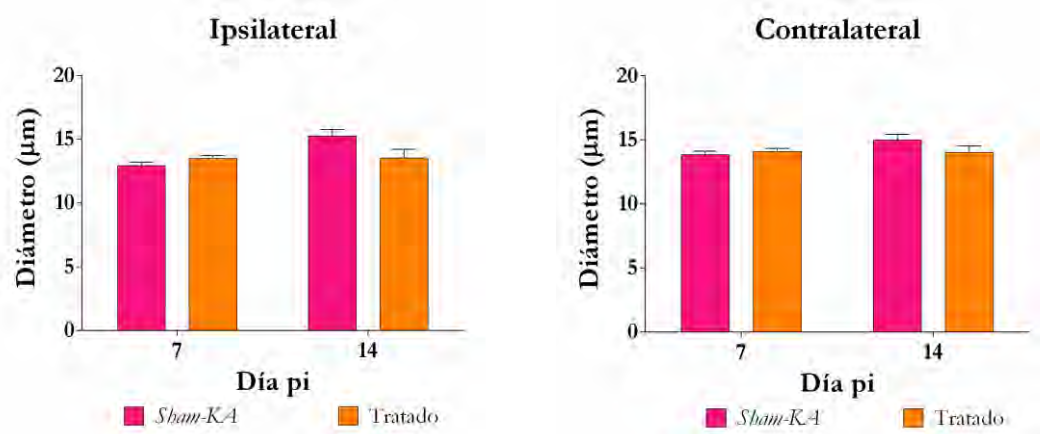


Figura A1.32. Izquierda. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha. Arriba: Diámetro de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

La comparación de los perímetros no mostró diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi y para ambas hemimédulas (**Fig. A1.33**). El valor

promedio de los perímetros para los dos grupos se incrementó hacia el día 14, en ambas hemimédulas.

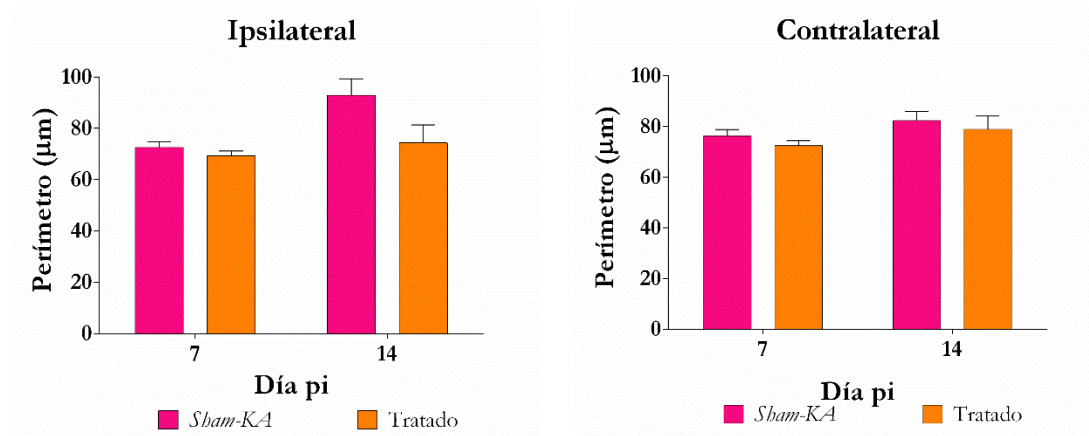


Figura A1.33. Izquierda. Arriba: Perímetro de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$. Derecha. Arriba: Perímetro de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

La comparación del parámetro redondez evidenció la existencia de diferencias significativas entre los grupos para todos los días pi en la hemimédula ipsilateral y para el día 7 pi en la hemimédula contralateral (**Fig. A1.34**). El grupo *sham* aumentó su valor promedio hacia el día 14 pi en la hemimédula ipsilateral y lo redujo en la contralateral. El grupo tratado aumentó levemente su valor promedio hacia el día 14 en ambas hemimédulas.

El diámetro feret no fue significativamente diferente entre los grupos en ninguno de los días pi y en ambas hemimédulas (**Fig. A1.35**). Los grupos *sham* y Tratado incrementaron su valor promedio hacia el día 14 pi en el lado ipsilateral, el primero en forma más marcada que el segundo. El mismo comportamiento se observó para el lado contralateral.

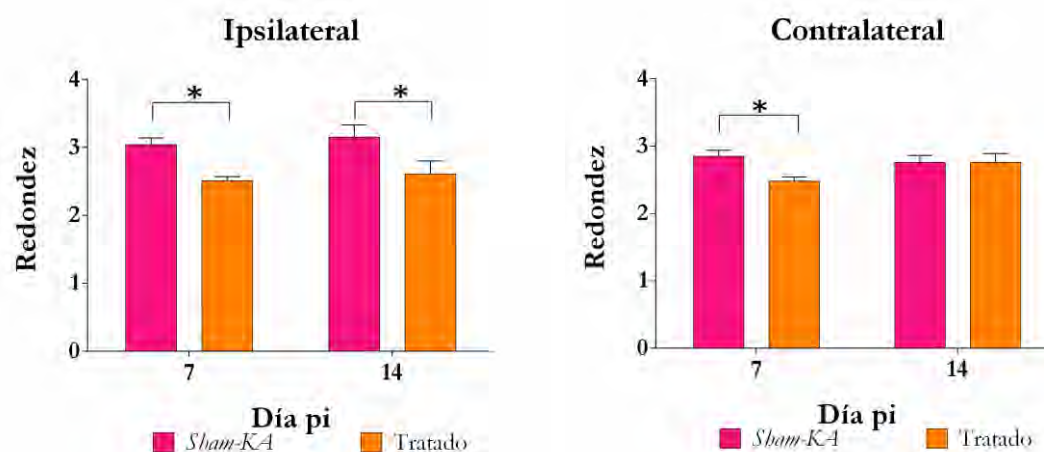


Figura A1.34. Izquierda: Redondez de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. **sham vs. tratado*. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

Derecha: Redondez de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. **sham vs. tratado*. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P < 0,50$.

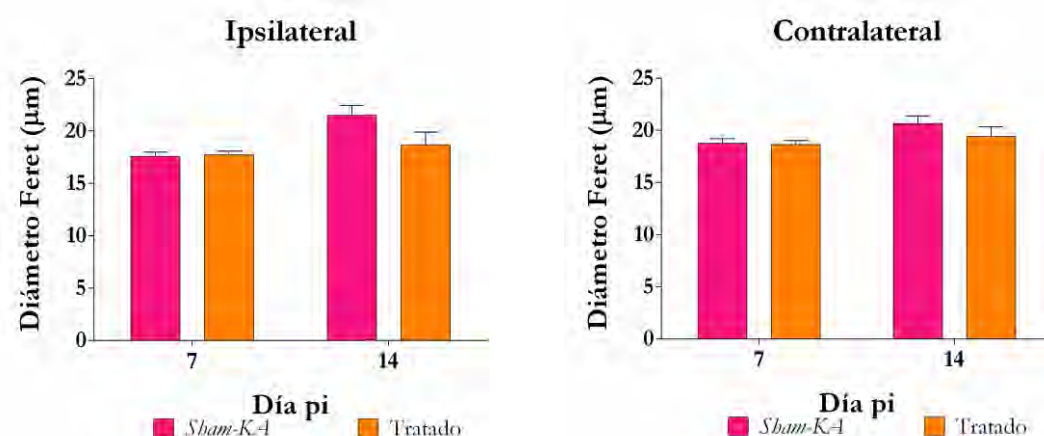


Figura A1.35. Izquierda: Diámetro feret de las neuronas de la región media de la hemimédula ipsilateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

Derecha: Diámetro feret de las neuronas de la región media de la hemimédula contralateral en función del día pi. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se presentan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.

A1.4. Recuento neuronal

Una vez determinada la concentración de lidocaína a utilizar, se llevó a cabo el recuento neuronal en los segmentos C4 y C6 de los animales del grupo L05, a fin de verificar que la inyección, la concentración y la dosis de lidocaína aplicadas no causaban alteraciones en los segmentos contiguos al sitio de inyección. El recuento neuronal basado en la tinción con violeta de cresilo no mostró diferencias significativas entre los grupos control, *sham*, L05, tanto para el segmento C4 como para el C6 y en ambas hemimédulas (**Fig. A1.36**).

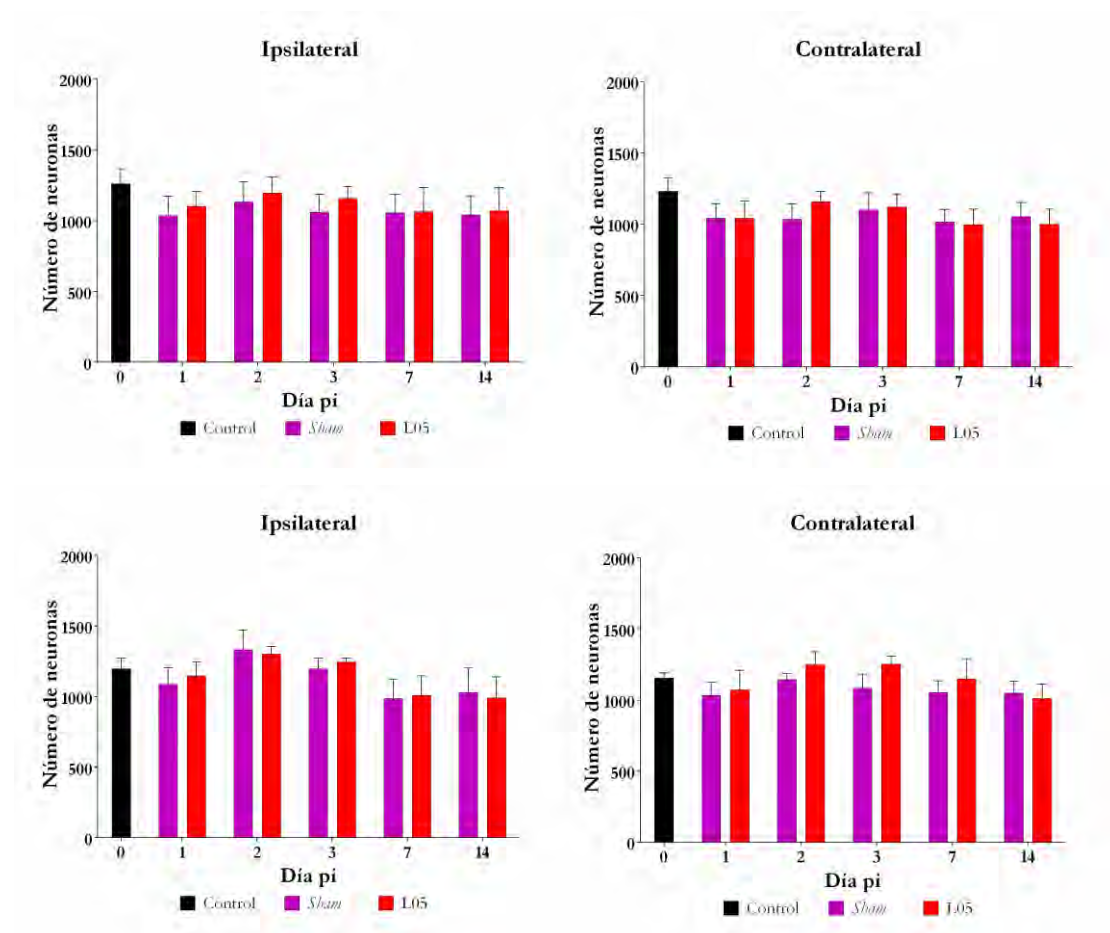


Figura A1.36. Recuento de neuronas para los segmentos C4 (arriba) y C6 (abajo), para las hemimédulas ipsilaterales (a la izquierda) y contralaterales (a la derecha). No se hallaron diferencias significativas para ninguno de los días pi. Los valores se expresan como Media \pm SEM; $P > 0,50$.